

# **Nachweis der Humanbelastung und klinische Relevanz des Weichmachers DEHP, sowie ausgewählter Metabolite**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Henrik Jungclas  
aus Marburg

Marburg 2006

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 27.10.2006 angenommen

Erstgutachter: Prof. Dr. W. Ensinger

Zweitgutachter: PD. Dr. Dr. H. G. Wahl

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2006

<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Weichmacher	5
1.1.1 <i>Phthalate</i>	6
1.1.2 <i>Adipate</i>	7
1.1.3 <i>Zitrate</i>	7
1.1.4 <i>Trimellitate</i>	8
1.1.5 <i>Phosphate</i>	8
1.1.6 <i>Cyclohexandicarbonsäureester</i>	8
1.2 Aufgabenstellung	9
 <b>2. Aktueller Wissensstand</b>	 <b>10</b>
2. 1 Verbreitung von DEHP	10
2.2. Resorption / Verteilung von DEHP im Körper	13
2.3 Gesundheitsschädliche Wirkung von DEHP	14
2.3.1 <i>Toxische Wirkung</i>	14
2.3.2 <i>Reproduktionstionstoxizität</i>	14
2.3.3 <i>Cancerogene Wirkung</i>	15
2.3.4 <i>Toxische Wirkung auf andere Organe</i>	15
2.3.5 <i>Veränderung der Immunantwort</i>	16
2.3.6 <i>Peroxisome Proliferator aktivierter Rezeptor (PPAR) induzierte Effekte</i>	17
2.4 Metabolisierung	17
2.5 Analytik	22
2.5.1 <i>Analytik von DEHP und DEHP-Metaboliten in humanem Serum/Plasma</i>	22
2.5.1 <i>Analytik von DEHP-Metaboliten in Humanurin</i>	23
 <b>3. Material und Methoden</b>	 <b>26</b>
3.1 Weichmacheranalytik	26
3.2 Klinische Studien zur Weichmacherbelastung im Serum von chronischen Dialysepatienten	28
3.3 Molekularbiologische Untersuchungen	29
3.3.1 <i>Zeitabhängige Stimulation von Jurkat E6.1 Zellen mit DEHP</i>	29
3.3.2 <i>RNA-Aufreinigung aus einer Zellsuspension und DNase-Verdau</i>	29
3.3.3 <i>RNA-Quantifizierung</i>	29
3.3.4 <i>Reverse Transkription</i>	29

3.3.5 Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	30
3.3.6 Übersicht der verwendeten Primer	31
3.3 Tierexperimentelle Untersuchungen	32
3.3.1 Versuchstiere und Tierhaltung	32
3.3.2 Protokolle zur Induktion einer Atemwegsreaktion	32
3.3.3 Messung der Atemwegsreagibilität gegenüber $\beta$ -Methyl-Acetylcholin (MCh)	35
3.3.4 Gewinnung von Serumproben	36
3.3.5 Broncho-alveoläre Lavage	37
3.3.6 Zellzählung und Zelldifferenzierung in der broncho-alveolären Lavage	37
3.3.7 Lungenhistologie	37
3.3.8 Konzentrationsbestimmung von Immunoglobulinen aus Serum mittels Enzyme-linked Immuno Sorbent Array (ELISA)	38
3.3.9 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen in der bronchoalveolären Lavage mittels Cytometric Bead Array (CBA)	40
3.3.10 Extraktion und Derivatisierung der Fettsäuren aus Serumproben	40
3.3.11 Gaschromatographische Analyse	41
3.3.12 Bestimmung von Leukotrien B <sub>4</sub> aus Serum und BAL mittels Enzym-Immuno- Assay	41
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>42</b>
4.1 Serumanalytik	42
4.1.1 Auswahl der internen Standards	42
4.1.2 Etablierung des Extraktionsverfahren	42
4.1.3 Auswahl der Derivatisierung	43
4.1.4 Trenn- und Detektionsverfahren	44
4.1.5 Kalibration	47
4.1.6 Bestimmung der Leerwerte	47
4.1.7 Nachweisgrenzen	48
4.1.8 Wiederfindungsrate aus Serum	50
4.2 Urinanalytik	51

4.2.1 Interne Standards, Trenn- und Detektionsverfahren	51
4.2.2 Extraktion und Derivatisierung	51
4.2.3 Nachweisgrenzen	54
4.2.4 Wiederfindungsrate aus Urin	55
4.3 Klinische Studie zur Messung der Weichmacherbelastung in Hämodialysepatienten	56
4.4 Molekularbiologische Untersuchungen	57
4.4.1 Methodenentwicklung für die Probenvorbereitung der PCR	57
4.4.2 Light-Cycler-PCR	59
4.5 Tierexperimentelle Untersuchungen	64
4.5.1 Kurzzeitexposition mit DEHP	64
4.5.2 Verstärkung einer akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge und Immunmodulation während der Sensibilisierungsreaktion	68
<b>5. Diskussion</b>	<b>72</b>
5.1 Analytik	72
5.2 Klinische Studie zur Weichmacherbelastung im Serum von chronischen Hämodialysepatienten	73
5.3 Molekularbiologische Arbeiten	75
5.4 In vivo Arbeiten	77
5.4.1 Exposition mit DEHP führt zu einer NGF-abhängigen Atemwegsreaktion	77
5.4.2 Die Verstärkung der OVA-induzierten Atemwegsreaktion durch DEHP ist Leukotrien B4 abhängig	79
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>84</b>
<b>8. Literaturliste</b>	<b>96</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>118</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Weichmacher

Eine allgemeine Definition für Weichmacher besagt, dass diese durch Zugabe eine Substanz weicher, stabiler und leichter zu handhaben machen. Folgt man dieser Definition, so stellt Wasser, das im Hüttenbau dem Lehm zugefügt wurde, den ersten Weichmacher der Menschheit dar (2). Der erste patentierte Weichmacher war Campher, der ab 1870 zusammen mit Nitrocellulose in der Photoindustrie eingesetzt wurde, um Celluloid herzustellen. Heutzutage verbindet man den Begriff Weichmacher in erster Linie mit organischen Verbindungen, die Polymeren zugesetzt werden, um deren Eigenschaften vorteilhaft zu beeinflussen.

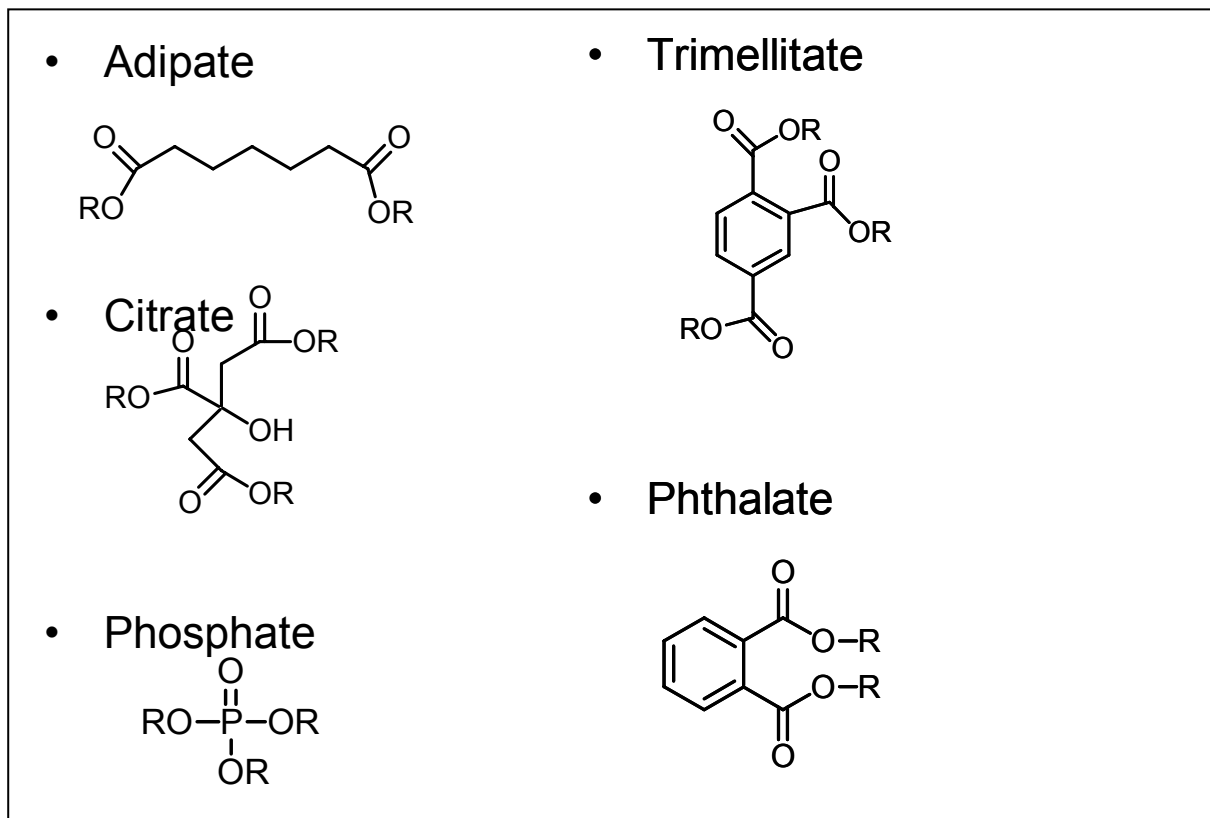


Abb. 1: Strukturen verschiedener Weichmacher

Es gibt über 300 verschiedene Weichmacher, von denen 50-100 kommerziell genutzt werden (3). Die Mehrheit sind Ester aus Phthalsäure, Adipinsäure, Zitronensäure, Phosphorsäure, und Trimellinsäure mit verschiedenen Alkoholen der Kettenlänge  $C_1$  bis maximal  $C_{17}$ . Prinzipiell gilt, dass mit zunehmender Kettenlänge des Alkohols Flüchtigkeit, Effizienz der Plastifizierung, Einfachheit der Verarbeitung und Wasserlöslichkeit abnehmen und die Fettlöslichkeit zunimmt.

### 1.1.1 Phthalate

Phthalate werden als Weichmacher für den Kunststoff Polyvinylchlorid (PVC) seit mehr als 40 Jahren eingesetzt und in großen Mengen produziert. Die Gruppe der Phthalate stellt in Westeuropa einen Marktanteil von 90% der gesamten Weichmacherproduktion 2001. In dieser Gruppe machen die drei Einzelsubstanzen Di-(ethylhexyl)Phthalat (DEHP), Di-isononylphthalat (DINP) und Di-isodecylphthalat (DIDP) 85% der Gesamtproduktion aus (4). 50% der Jahresproduktion entfällt allein auf den Weichmacher DEHP. Das bedeutet allein in Westeuropa eine Produktion von jährlich ungefähr 480.000 Tonnen DEHP (5;6). Phthalate sind Di-Ester der ortho-Phthalsäure (Tabelle 1) mit Alkoholen der Kettenlänge C<sub>1</sub> bis C<sub>13</sub>. Ester der para-Phthalsäure sind als Terephthalate im nordamerikanischen Raum in Gebrauch. Ca. 97% des auf dem europäischen Markt befindlichen DEHP wird als Weichmacher in Kunststoffen überwiegend in PVC eingesetzt. 78% dieser Kunststoffe werden zu Produkten in Innenräumen (Fußbodenbeläge, Vinyltapeten) und 22% zu Produkten in Außenanwendungen (Schuhsohlen, Planen, Kabelisolierungen) weiterverarbeitet. Die Verarbeitung in Farben und Dichtungen macht 3% der DEHP-Produktion aus.

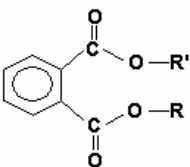
			
R	R'	Substanz	
-H	H	Phthalsäure	PA
-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>	Dimethyl Phthalat	DMP
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	Dibutyl Phthalat	DBP
-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	Butyl Benzyl Phthalat	BBP
-CH <sub>2</sub>   CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>   CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> )	-CH <sub>2</sub>   CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>   CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Di(2-Ethylhexyl) Phthalat	<b>DEHP</b>
		Di-isoctyl Phthalat	DIOP
		Di-isononyl Phthalat	<b>DINP</b>
		Di-isodecyl Phthalat	<b>DIDP</b>
		Di-isotridecyl Phthalat	DTDP

Tabelle 1: Die wichtigsten Phthalate

Auch im medizinischen Sektor ist PVC und damit auch das DEHP weit verbreitet. Allein in Deutschland werden jährlich 30.000 Tonnen PVC in medizinischen Artikeln verarbeitet; DEHP kann bis zu 60 Gewichtsprozent dieser Menge ausmachen. PVC-Produkte werden eingesetzt als Behälter (Infusionen, Sammelgefäße), Schlauchsysteme (Infusions- und Dialysesysteme, Katheter) und Schutzvorrichtungen (Handschuhe, Sauerstoffzelt).

Je nach Einsatzbereich der Erzeugnisse tendieren additive Weichmacher dazu, im Laufe der Zeit in die Umwelt freigesetzt zu werden, da sie nur physikalisch im Kunststoff gelöst und nicht chemisch mit ihm verbunden sind. DEHP ist aufgrund dieser Freisetzungen und seines ubiquitären Einsatzes in allen Umweltmedien und auch in der Bevölkerung zu finden.

### **1.1.2 Adipate**

Von den Estern der Adipinsäure wird insbesondere Di(2-ethylhexyl)adipat (DEHA oder DOA) als Weichmacher in PVC eingesetzt. Des weiteren wird Di-iso-nonyladipat (DNA) verwendet.

Im Vergleich zu Phthalaten führen Adipate zu besseren Tieftemperatureigenschaften und geringerer Plastisoleigenschaft (7) des Weich-PVCs. DEHA ist allerdings flüchtiger und Untersuchungen der Migrationsraten aus PVC-Folien in Lebensmittel zeigen, dass je nach Fettgehalt DEHA bis zu dreimal schneller in Lebensmittel übergeht als DEHP. Auch die Extrahierbarkeit in wässriger Phase scheint bei DEHA höher zu liegen (8).

Adipate dienen vor allem im Bereich der Lebensmittelverpackungen als Alternative zu Phthalaten. Bereits seit Mitte der 80-er Jahre werden Adipate in sogenannten „Cling-Folien“ für Lebensmittel verwendet. Außerdem werden sie in Fußbodenbelägen und Vinyltapeten eingesetzt (9).

### **1.1.3 Zitate**

Von den Estern der Zitronensäure wird insbesondere Acetyltributylcitrat (ATBC) als Weichmacher in PVC-Produkten eingesetzt. Zitate finden Verwendung im Lebensmittelbereich und als Ersatz für die verbotenen Phthalate in Kinderspielzeugen, die zum Kauen und Nuckeln gedacht sind. In Großbritannien werden Zitate als Weichmacher in Medizinprodukten verwendet (10). Zitate sind



biologisch abbaubar und nicht toxisch. Für Außenanwendungen sind Zitronensäureester allerdings nicht geeignet, da sie durch Mikroorganismen abgebaut werden können. Zudem sind Zitratsäureester drei bis viermal teurer als die entsprechenden Phthalate. Insgesamt finden sie daher nur eine geringe Anwendung als Weichmacher.

#### **1.1.4 Trimellitate**

Trimellitate weisen gegenüber den Phthalaten eine dritte Estergruppe auf, woraus ein höheres Molekulargewicht und ein größeres Molekylvolumen resultieren. Sie sind weniger flüchtig als DEHP und werden daher besonders in der Automobilindustrie zur Verminderung des „Fogging-Problems“ verwendet. Auch Anwendungen in speziellen elektrischen Kabelisolierungen und Medizinprodukten sind bekannt. Allerdings sind die toxischen und ökotoxischen Daten zu Trimellitat-Weichmacher sehr unvollständig.

#### **1.1.5 Phosphate**

Phosphate werden aufgrund ihrer flammhemmenden und weichmachenden Eigenschaften überall dort eingesetzt, wo der Brandschutz besonders im Vordergrund steht. Da die weichmachende Wirkung sehr viel geringer ist als bei den Phthalaten und Phosphate zudem deutlich teurer sind, ist ihr Einsatz auf dieses spezielle Gebiet begrenzt. Viele Phosphorsäureester sind als umweltgefährlich eingestuft und weisen humantoxische Eigenschaften auf.

#### **1.1.6 Cyclohexandicarbonsäureester**

Die Ester der Cyclohexandicarbonsäure wurden als alternativer Weichmacher zu DEHP entwickelt. Die möglichen Anwendungen werden zur Zeit erprobt, da die technischen Eigenschaften mit denen des DEHP vergleichbar sind, sollte die Umstellung auf diesen Weichmacher mit geringem Aufwand verbunden sein. Diisononylcyclohexan (DINCH) wurde als Neustoff gemeldet, die Einsatzrisiken werden noch untersucht. Bisherige Ergebnisse sprechen aber dafür, dass DINCH als Reinstoff zwar reizend, aber weder giftig noch ökotoxisch oder persistent ist.

## 1.2 Aufgabenstellung

1. Entwicklung und Validierung einer Detektionsmethode für den Weichmacher DEHP und seiner primären und sekundären Metabolite MEHP, Ethylhexanol, Phthalsäure und Ethylhexansäure in einer simultanen Messung mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Die Detektion erfolgt massenspektrometrisch an HP 5971 Massendetektoren.
2. Überprüfung der Methode anhand einer Pilotstudie zum Vergleich der Weichmacherbelastung von gesunden Probanden und Patienten der chronischen Dialyse.
3. Bestimmung der Wirkung immunotoxikologischer Eigenschaften von DEHP im
  - Zellstimulationsversuch an Jurkat E6.1 T-Lymphozyten zur Bestimmung einer Veränderung der Immunantwort anhand einer Reihe für die unterschiedlichen Immunantworten wichtigen Gensequenzen
  - Belastungsversuche an C57Bl6- (normale Immunantwort) und Balb/C- (für eine Th2-Immunantwort prädisponierte Tiere) Mausstämmen zur Bestimmung der immunotoxikologischen Effekte nach Kurzzeit- oder Langzeitbelastung.

## 2. Aktueller Wissensstand

### 2.1 Verbreitung von DEHP

Experten gehen davon aus, dass etwa sechs Prozent des Marktvolumens an DEHP durch Synthese, verschiedene Verarbeitungsprozesse und nicht einsammelbare Altprodukte in die Umwelt freigesetzt werden, allein in Westeuropa etwa 29.000 t. Tabelle 2 zeigt einen Überblick über die publizierten Daten zum Umweltvorkommen von DEHP.

Quelle		Konzentrationen
Luft	über Land	0,3 - 2,7 ng/m <sup>3</sup>
	über Meer	22 ng/m <sup>3</sup>
Wasser	Fluss	bis 4,0 µg/l
	Grundwasser	20 - 170 µg/l
Erde	Boden	1,5 mg/kg Trockengewicht
	Flussschlamm	0,02 - 0,22 mg/kg Trockengewicht

Tabelle 2: Umweltvorkommen von DEHP (modifiziert nach (11))

In der Atmosphäre kann DEHP nur zu einem sehr geringen Teil photooxidiert werden, so dass es durch nachfolgende Niederschläge zu einer Bioakkumulation in Böden und Gewässern kommt. Unter aeroben Bedingungen kann ein relativ schneller Abbau durch Mikroorganismen, mit einer Halbwertszeit zwischen zwei und vier Wochen erfolgen (12;13). Bei diesem Prozess wird DEHP über MEHP zu Phthalsäure hydrolysiert, die entsprechend der Benzoesäure über Pyruvat und Succinat zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O abgebaut werden kann. Da dieser Vorgang unter anaeroben Bedingungen zum Erliegen kommt und eine chemische Hydrolyse praktisch nicht stattfindet, ist die Halbwertszeit von DEHP mit über 100 Jahren entsprechend hoch (14).

Bedingt durch diese permanente Umweltbelastung und die Nutzung von DEHP in vielen Gegenständen des täglichen Bedarfs, ist es nicht verwunderlich, dass mittlerweile von einer DEHP-Belastung der gesamten Bevölkerung ausgegangen

wird (15). Wie allumfassend diese Belastung in Europa mittlerweile ist, zeigt die Tatsache, dass bereits in Neugeborenen DEHP nachgewiesen werden kann (16).

Mehrere Expositionsquellen tragen zur Gesamtbelastung der durchschnittlichen Bevölkerung bei. Den größten Anteil daran hat die Aufnahme von DEHP durch Lebensmittel (17;18). DEHP und das analoge Adipat DEHA wurde in vielen Lebensmitteln und Lebensmittelprodukten wie Fisch, Fleisch, Milch, Ölen und Babynahrung gefunden (19-29). In sehr fetten Lebensmitteln wie Käse oder Ölen kann der Gehalt an DEHP sogar bis in einen Bereich zwischen 31 und 150 mg/kg Lebensmittel ansteigen.

Die Ursache der Kontamination ist dabei in der Umwelt (direkte Nahrungskette) und in der Nahrungsmittelproduktion zu sehen.

Einen weiteren Expositionsweg stellt die Atemluft dar. Zwar wird diese Belastung aufgrund des niedrigen Dampfdruckes von DEHP im allgemeinen als gering eingestuft, allerdings können in Innenräumen, in denen DEHP-haltige Werkstoffe wie z.B. Bodenbeläge, Teppiche, Vorhänge oder Farben verarbeitet wurden (30-33), sowie in Bereichen in denen DEHP produziert oder verarbeitet wird, hohe DEHP Konzentrationen auftreten.

Im Fall kleiner Kinder kam bisher eine weitere Belastung durch Kauen und Saugen an DEHP-haltigem Spielzeug hinzu (34;35). Mittlerweile ist der Gebrauch von Phthalaten in Kinderspielzeugen in der europäischen Union jedoch verboten worden (36). Auch in Schwimmflügeln ist DEHP in hohen Dosen enthalten und trägt zur Gesamtexposition bei.

Eine weitere, nicht zu unterschätzende DEHP-Quelle sind medizinische Produkte, da bei deren Herstellung DEHP-haltiges Weich-PVC 28% Marktanteil einnimmt. Typische Erzeugnisse sind Verbrauchsgegenstände für die Dialyse, Infusionen und Transfusionen von Blut und Blutkomponenten, Beatmungshilfen und künstliche Ernährungssonden.

Die Aufnahme von DEHP in den Organismus kann über die Atemwege, Verdauungstrakt, Haut und direkt intravenös erfolgen. Während in einer Vielzahl von Studien die direkte Aufnahme von DEHP bei Nagetieren und Primaten (37-51) über

jeden der oben genannten Wege untersucht wurde, gibt es für den Menschen bisher nur eine Studie, bei der die orale Aufnahme von DEHP an zwei Kontrollpersonen untersucht wurde (52). Die dermale Resorption von DEHP ist gering. In einem Versuch mit <sup>14</sup>C-markiertem DEHP, bei dem DEHP gelöst in Ethanol auf den Unterarm von Freiwilligen aufgetragen wurde, wurden 1,8% der Dosis in den ersten 24 Stunden resorbiert; 1,1% der applizierten Radioaktivität wurden in den darauf folgenden 7 Tagen mit dem Urin ausgeschieden (53). Im Gegensatz zu anderen Xenobiotika kann die intravenöse oder parenterale Aufnahme an DEHP aus medizinischen Bedarfsgegenständen für einzelne Bevölkerungsgruppen, insbesondere Dialysepatienten und Personen, die häufiger eine Bluttransfusion erhalten, der mit Abstand bedeutendste Aufnahmepfad sein. Dies gilt auch und insbesondere für immature und prämatüre Neugeborene sowie Kleinkinder, die parenteral ernährt werden und / oder der dauernden medizinischen Versorgung bedürfen. Untersuchungen von Loff et al. (54) zeigen, dass die tägliche DEHP-Dosis, die bei der parenteralen Ernährung von Frühgeborenen mit „verabreicht“ wird und die aus Aufbewahrungsbehältnissen und Infusionsbestecken aus PVC-haltigen Materialien stammt, mindestens 10 mg beträgt, aber durchaus auch 20 mg erreichen kann. Hierbei ist zu beachten, dass während der Lagerung, z.B. des Bluts in DEHP-haltigen PVC-Beuteln, nicht nur DEHP aus dem Beutelmateriale in das Blut übergeht, sondern gleichzeitig die MEHP-Konzentration im gelagerten Blut ansteigt, weil MEHP durch enzymatische Hydrolyse aus DEHP gebildet wird (55;56). Neugeborene, die eine Bluttransfusion bekommen hatten, wiesen unmittelbar nach der Transfusion Plasmaspiegel bis zu 11,4 mg/L an DEHP und bis zu 15 mg/L an MEHP auf (57). Bei einer Blutaustauschtransfusion können bis zu 300 mg an DEHP auf den Patienten übertragen werden (58). Eine sehr ausführliche Abschätzung der Aufnahmemengen an DEHP aus PVC-haltigen Medizinprodukten und der damit verbundenen Gefährdung wurde kürzlich von der US-FDA (United States Food and Drug Administration) (59) veröffentlicht.

Auch über die Inhalation bei Berufstätigen in der Weichmacherindustrie gibt es bisher nur indirekte Hinweise (60;61), es gilt aber als erwiesen, dass auch der menschliche Organismus über die beschriebenen Wege DEHP aufnehmen kann.

## 2.2 Resorption / Verteilung von DEHP im Körper

Bei oraler Aufnahme sollen, in Abhängigkeit von der Dosis an DEHP, zwischen 4,5% (Dosis: 10 g) und 11-15% (Dosis: 30 mg) resorbiert werden (62;63). Die resorbierte Menge an DEHP wurde dabei über die Ausscheidung der Metaboliten im Urin bestimmt. In einer Expositionsstudie an Affen wurden 30% der verabreichten Dosis (100 mg/kg) im Urin wiedergefunden (64). Wesentlich höhere Aufnahmeraten wurden bei Verabreichung von <sup>14</sup>C-markiertem DEHP an Ratten und Meerschweinchen festgestellt (62). In den Resorptionsversuchen mit Nagetieren erwies sich die biliäre Ausscheidung als bedeutend. Es muss deshalb angenommen werden, dass eine Abschätzung der Resorption an DEHP beim Menschen, die nur die Ausscheidung an DEHP-Metaboliten im Urin berücksichtigt, zur Unterschätzung der Aufnahmewerte führt, da relevante Mengen an DEHP über die Galle mit den Faeces ausgeschieden werden. Diese soll 20-25% der verabreichten Dosis ausmachen (65). Koch et al. (66) finden nach oraler Gabe von isotonenmarkiertem DEHP in einer Humanstudie 47% der Dosis als MEHP, 5OH-MEHP und 5oxo-MEHP im Urin wieder. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass weitere mengenmäßig bedeutende Metabolite im Urin ausgeschieden werden, kann davon ausgegangen werden, dass ein Großteil des oral applizierten DEHP beim Menschen im Urin ausgeschieden wird (67). Dies bedeutet aber auch, dass deutlich über 50% des oral applizierten DEHP resorbiert werden und systemisch zur Verfügung stehen. Quantitative Daten zur Resorption bei inhalativer Exposition liegen bis heute nicht vor. Wegen der ausgeprägten Lipophilie des DEHP ist jedoch eine gute Resorption zu vermuten. Über die dermale Resorption von DEHP beim Menschen liegen keine Daten vor. Es ist jedoch von einer nur geringen Aufnahme über die Haut auszugehen, da in Experimenten mit Ratten nur ca. 5% der auf die Haut aufgetragenen Dosis (2 mg/cm<sup>2</sup>) innerhalb von 7 Tagen resorbiert wurden (68). Über die Verteilung von DEHP und seinen Metaboliten im Körper des Menschen nach oraler Exposition liegen bisher keine Daten vor. Untersuchungen an Ratten mit <sup>14</sup>C-markiertem DEHP zeigen, dass die Radioaktivität sich schnell in alle untersuchten Organe (Nieren, Leber, Fettgewebe, Skelettmuskeln, Lungen, Testes und Herz) ausbreitet, wobei die Leber die höchsten spezifischen Aktivitäten aufweist (62).

## 2.3 Gesundheitsschädliche Wirkung von DEHP

DEHP hat sich seit über 30 Jahren als führender Weichmacher behauptet, obwohl bis heute eine Reihe verschiedener gesundheitlicher Gefährdungen nachgewiesen wurden, die bis dato DEHP zugeschrieben werden.

Von diesen vielen verschiedenen Wirkungen sollen die wichtigsten und bekanntesten in den folgenden Untergruppen vorgestellt werden.

### 2.3.1 Toxische Wirkung

DEHP zeigt nur ein geringes Maß an akuter Toxizität, da diese mit zunehmendem Molekulargewicht der Phthalate abnimmt (69;70). In verschiedenen Studien wurden Untersuchungen der LD<sub>50</sub> für die verschiedenen Aufnahmearten oral, intravenös, und peritoneal vorgenommen. Eine Untersuchung der Toxizität einer Aufnahme über die Lunge wurde bislang nicht durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Diese Untersuchungen wurden für mehrere Spezies vorgenommen: zur Vereinfachung werden hier jedoch nur die Ergebnisse an Mäusen gezeigt.

Expositionsart	LD <sub>50</sub> g/kg KG	Literatur
oral	26	( <u>71</u> )
intravenös	1,4	( <u>72</u> )
intraperitoneal	14-38	( <u>73;74</u> )

Tabelle 3 LD<sub>50</sub>-Werte (Maus) nach DEHP-Exposition für die verschiedenen Expositionsarten

### 2.3.2 Reproduktionstoxizität

Die toxischen Wirkungen von DEHP auf Reproduktionsorgane beginnen mit einer Verkleinerung der Hoden und erstrecken sich über eine Abnahme von Zahl und Qualität der Spermien bis hin zum vollständigem Verlust der Spermatogenese (75-78) in männlichen Ratten und Mäusen. Weibliche Tiere leiden unter Verlängerung der Zyklusdauer, unterdrückte oder verspätete Ovulation, Gewichtsabnahme von Ovarien und Uterus, Funktionsverlust der Östrogen produzierenden Granulosazellen sowie Abnahme der Fertilität (79-82). Auch die Feten der in-utero DEHP exponierten Nachkommen, besonders die F2-Generation, erleiden Entwicklungsstörungen und

teratogene Schädigungen (83), wie Abnahme der Implantation, Spontanaborte, histologische Veränderungen an Leber, Niere und Hoden, Gewichtsabnahme von Niere und Hoden, Malformation von Skelett, Herz und Niere und Absterben des Feten (84-88).

Für die beschriebenen Effekte ist es bis heute nicht möglich, einen unteren Schwellenwert zu identifizieren, unterhalb dessen keine negativen Wirkungen auftreten. Obwohl sich sehr viele Studien daran versucht haben und Schwellenwerte angeben, zeigen neuere Untersuchungen, dass auch unterhalb dieser Grenzen bisher nicht untersuchte Wirkungen hervorgerufen werden können (83).

### **2.3.3. Cancerogene Wirkung**

Seit den frühesten Studien (zum Beispiel (89) oder (90)) zum Thema Cancerogenität werden die Ergebnisse sehr kontrovers diskutiert. Lieferten die frühen Studien, vermutlich aufgrund des nicht adäquaten Studiendesigns (zu geringe Fallzahl, niedrige Überlebensrate, lückenhafte Daten), noch negative Ergebnisse, so wurden diese in neueren Studien widerlegt. In der 1982 publizierte amerikanische National Toxicology Program Studie an männlichen und weiblichen Ratten und Mäusen (91) konnte gezeigt werden, dass DEHP zu einer höheren Wahrscheinlichkeit des Auftretens von hepatozellulären Karzinomen in Mäusen (6000 ppm DEHP in der Nahrung für 2 Jahre) und Ratten (12000 ppm DEHP in der Nahrung für 2 Jahre) führt. In weiteren Studien konnten diese Daten reproduziert werden (92-99), wengleich auch eine gewisse Kritik an der Höhe der Dosis geäußert wurde (100). Seit Mitte der neunziger Jahre wird die Cancerogenität auf eine Stimulation des Peroxisomen-Proliferator-Aktivierten-Rezeptor alpha (PPAR- $\alpha$ ) zurückgeführt. Da dieser in Nagetieren deutlich prominenter vorhanden ist, als im Menschen, wurde DEHP in der neuesten Risikobeurteilung von „möglicherweise krebserregend“ auf „nicht klassifizierbar“ geändert (101).

### **2.3.4 Toxische Wirkung auf andere Organe**

Neben den beschriebenen Wirkungen auf Niere (signifikant erniedrigte Nierenfunktion mit erhöhten Kreatininwerten und ein vermehrtes Auftreten von Zysten (102;103)) und Herz soll in diesem Abschnitt besonders auf die Wirkung von DEHP auf die Lunge eingegangen werden.



Die Aufnahme über die Lunge stellt die für die Allgemeinbevölkerung wichtigste Inkorporationsart dar, da durch den alltäglichen Kontakt mit DEHP-haltigen Materialien besonders in Innenräumen große Mengen DEHP aufgenommen werden können.

Bereits 1975 wurde im Tierversuch zum ersten Mal durch Scholz et al. eine akute Lungentoxizität bis hin zum Tod nach der Exposition mit DEHP beschrieben (104). 1988 wurde dann zum ersten Mal von Roth et al. (105) von drei Frühgeborenen berichtet, die nach künstlicher Beatmung durch DEHP-haltige Schlauchsysteme dem klinischen Bild zufolge ungewöhnliche Lungenreaktionen entwickelten. In der Lunge eines der drei Frühgeborenen, das kurz nach der Geburt verstarb, konnte DEHP in der Lunge nachgewiesen werden. Der Zustand der anderen beiden verbesserte sich nach Austausch der PVC-Beatmungssysteme gegen Ethylen/Vinylacetat-Schläuche. Bei Ratten mit einer Inhalationsdosis von 230 mg/kg Körpergewicht/Tag wurde eine Gewichtszunahme der Lungen mit Verdickung der Alveolarsepten und erhöhter Proliferation von Schaumzellen beobachtet (106). Bisher konnte jedoch noch kein direkter Zusammenhang zwischen der aerosolen Exposition einer präzisen DEHP-Konzentration und der Entwicklung einer Atemwegsreaktion hergestellt werden, obwohl seit Jahren ein Zusammenhang zwischen der immer weiteren Verbreitung von PVC und dem verstärktem Auftreten asthmatischer Erkrankungen diskutiert wird (107).

### **2.3.5 Veränderung der Immunantwort**

Erste Anzeichen, dass die Exposition von Phthalaten auch zu einer veränderten Antwort des Immunsystems führen kann, wurden bereits 2001 durch Larsen et al. das erste Mal im Tierversuch vorgestellt (108). Dieser Effekt konnte mittlerweile durch die Stimulation von Allergieeffektorzellen bestätigt werden (109;110). Dabei stellte sich heraus, dass besonders eine Stimulation mit MEHP und DEHP, also den beiden Phthalaten mit acht C-Atom langen Seitenketten einen besonders hohen Histaminausstoß auslöst. Bislang sind die beschriebenen Effekte jedoch lediglich auf die Veränderung verschiedener immunologischer Parameter beschränkt. Ein Zusammenhang zwischen einer DEHP-Belastung und einem ausgeprägten klinisch immunologischen Krankheitsbild ist bis heute noch nicht beschrieben.

### **2.3.6 Peroxisome Proliferator aktivierter Rezeptor (PPAR) induzierte Effekte**

PPARs sind Mitglieder der Steroidrezeptor-Superfamilie, die zum ersten Mal 1990 von Isseman und Greene beschrieben wurden (111). Mittlerweile sind die verschiedenen Subtypen (PPAR  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\gamma$ ) mit unterschiedlicher Verteilung im Gewebe und unterschiedlichen biologischen Wirkungen identifiziert worden.

PPAR  $\alpha$  wird besonders im Leber-, Herz-, Nieren- und Muskelgewebe exprimiert, wo es unter anderem durch die Aktivierung der entsprechenden Desaturasen für die Regulation des Fettsäure-Abbau-Stoffwechsels mitverantwortlich zeichnet (112;113). PPAR  $\gamma$  liegt besonders angereichert in Adipozyten und Makrophagen vor und ist dort in die Adipozytendifferenzierung, die Lipidspeicherung und die Glukosehomeostase involviert (114-116).

PPAR  $\delta$  hingegen ist relativ gleichmäßig verteilt in allen Geweben zu finden. Es wurde bisher mit der Keratinocytdifferenzierung, der Wundheilung und der Regulierung der VLDL-Signale von Makrophagen in Verbindung gebracht (117-120).

Als Liganden konnten neben bestimmten endogenen Fettsäuren (121;122), Fettsäureester (123), und Prostaglandinen (124) auch wichtige Medikamente wie Fibrate (125), (126-128) oder nichtsteroidale Antiphlogistika (129) und neben DEHP auch weitere Umweltchemikalien (130-132) identifiziert werden.

Peroxisomen proliferierende Substanzen entfalten ihre Wirkungen in Leber und einigen anderen Organen über die Aktivierung von PPAR- $\alpha$  (133). Dadurch wird die Synthese peroxisomaler und einiger Cytochrom P450 abhängiger Enzyme angeregt und es kommt zur Vergrößerung und Vermehrung der Peroxisomen in Leber und anderen Organen (134;135). Vor allem in Nagetieren führt dieser PPAR- $\alpha$  abhängiger Prozess letztendlich zur Bildung von hepatozellulären Carcinomen (136-139).

Inwieweit die Proliferation von Peroxisomen dabei eine notwendige Voraussetzung für die Carcinogenität von DEHP darstellt ist noch nicht endgültig geklärt und wird kontrovers diskutiert (140).

## **2.4 Metabolisierung**

Aufgenommenes DEHP wird im Körper mit Hilfe von Lipasen relativ schnell durch Hydrolyse zu den primären Metaboliten Mono-(2-ethyl-hexyl)Phthalat und 2-Ethylhexanol abgebaut (141;142). Im Gegensatz zu Nagetieren (62;143) ist im

Menschen eine vollständige Hydrolyse zum Metaboliten Phthalsäure möglich. Im Fall von Hämodialysepatienten scheint dies sogar der bevorzugte Weg zu sein, da die Phthalsäurekonzentration im Plasma deutlich höher als die Konzentration von DEHP und MEHP ist (144;145).

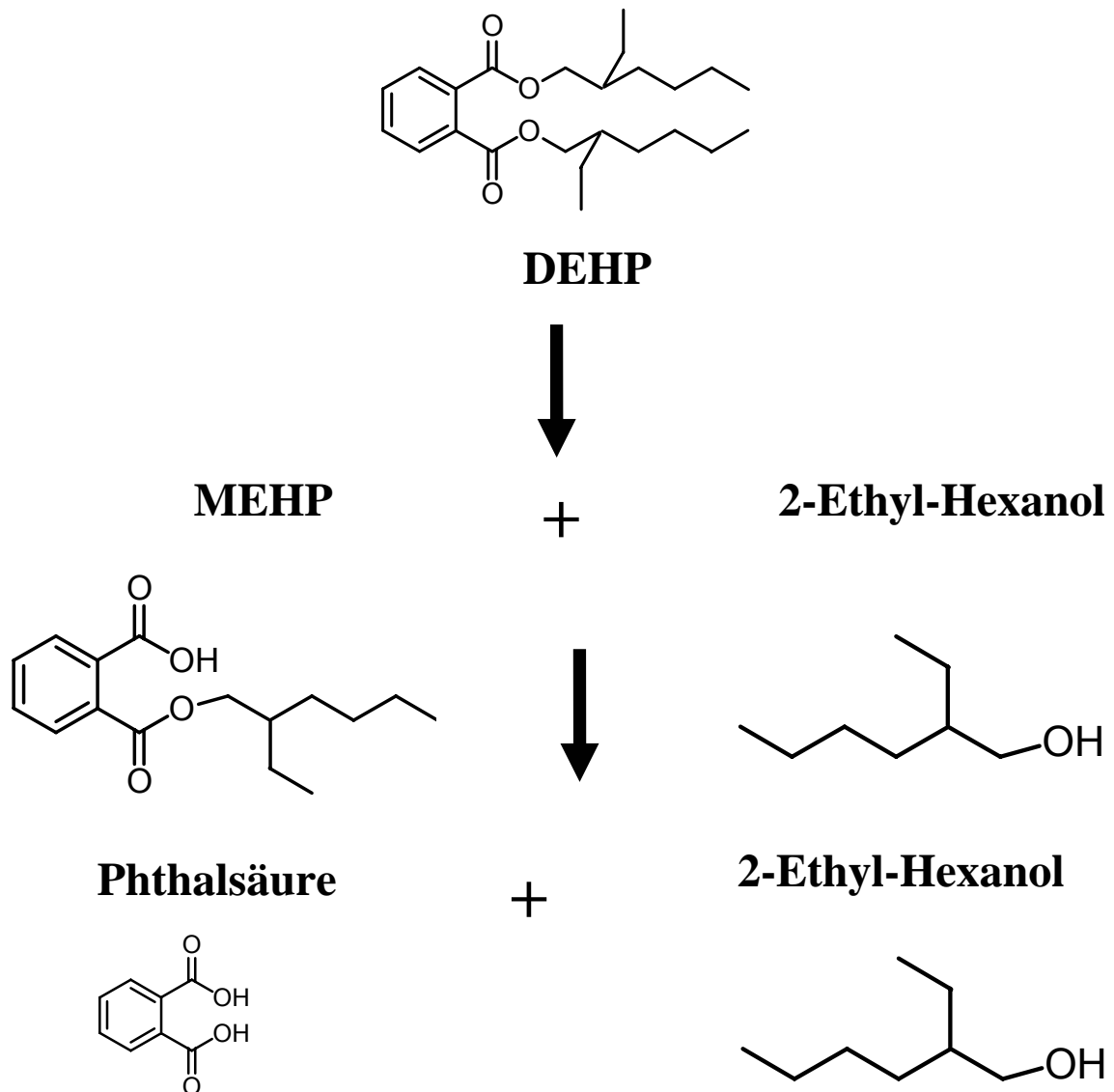


Abb. 2: Primäre Metabolisierung von DEHP

Die weitere Metabolisierung von MEHP (Oxidation durch P450 - abhängige Enzyme) ist schon seit den siebziger Jahren erschöpfend untersucht worden. Mittlerweile sind über 25 Metabolite in den unterschiedlichsten Oxidationsstadien identifiziert und (in unterschiedlichen Zusammensetzungen) sowohl in Nagetieren, als auch im Menschen nachgewiesen worden (62;146-157). Eine vollständige Übersicht dieser Metabolite ist in Tabelle 4 einzusehen.

Nr.		R'	R''
I	2-ethyl-3-carboxypropylphthalat	-CH <sub>2</sub> COOH	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
II	2-carboxyhexylphthalat	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-COOH
III	2-ethyl-4-carboxybutylphthalat	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> COOH	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
IV	2-carboxymethylhexylphthalat	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> COOH
V	2-ethyl-5-carboxypentylphthalat	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> COOH	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
VI	2-ethyl-5-oxohexylphthalat	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> -CO-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
VII	2-(2-hydroxyethyl)hexylphthalat	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH
VIII	2-ethyl-4-hydroxyhexylphthalat	-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
IX	2-ethyl-5-hydroxyhexylphthalat	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
X	2-ethyl-6-hydroxyhexylphthalat	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
XI	2-ethyl-pentylphthalat	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
XII	2-ethyl-4-oxyhexylphthalat	-CH <sub>2</sub> -CO-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
XIV	2-carboxymethyl-4-oxyhexylphthalat	-CH <sub>2</sub> -CO-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> COOH
XV	2-ethyl-4-oxy-6-carboxyhexylphthalat	-CH <sub>2</sub> -CO-CH <sub>2</sub> COOH	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
XVI	2-ethyl-4-hydroxy-6-carboxyhexylphthalat	-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> COOH	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
XVII	2-(1-hydroxyethyl)hexylphthalat	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-CHOH-CH <sub>3</sub>
XVIII	2-carboxymethyl-4-hydroxyhexylphthalat	-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> COOH
XIX	2-(1-hydroxyethyl)-5-hydroxyhexylphthalat	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>3</sub>	-CHOH-CH <sub>3</sub>
XX	2-ethyl-4,6-dihydroxyhexylphthalat	-CH <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
XXI	2-carboxymethyl-5-hydroxyhexylphthalat	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> -CHOH-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> COOH
XXV	2-carboxymethyl-5-oxyhexylphthalat	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>2</sub> -CO-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> COOH
XXVI	2-(1-oxyethyl)hexylphthalat	-[CH <sub>2</sub> ] <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	-CO-CH <sub>3</sub>

Tabelle 4 Die Metaboliten von MEHP nach (62)

Diesem Interesse an MEHP und seinen Metaboliten liegt die Erkenntnis zugrunde, dass auch für MEHP viele der oben aufgeführten toxischen Effekte nachgewiesen wurden und lange Zeit MEHP als die eigentliche toxische Komponente des Weichmachers vermutet wurde (158-164).

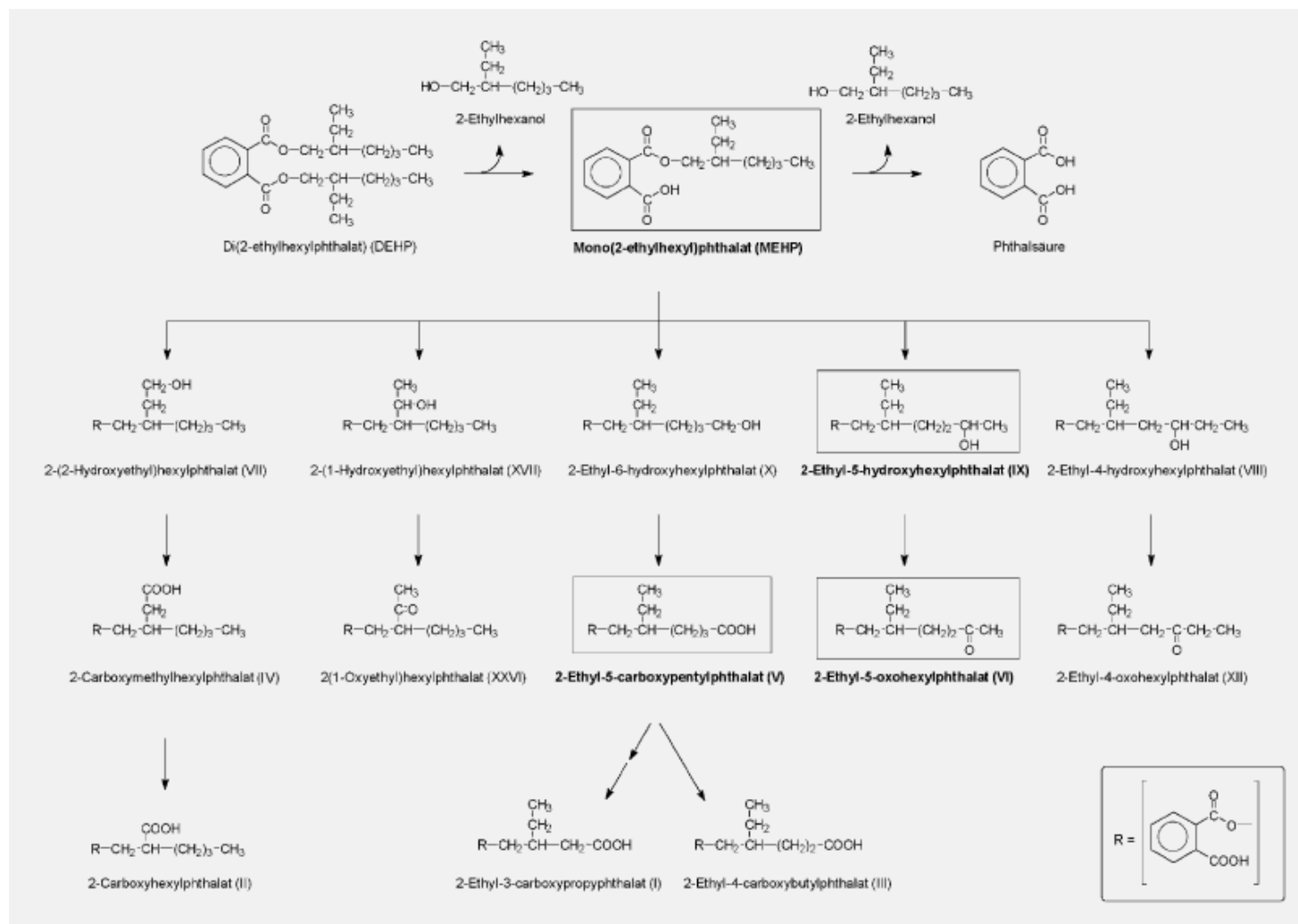


Abb. 3: Metabolisierung von DEHP und MEHP in vitro [nach (62;165)]

Die Untersuchung des weiteren Abbaus von Ethylhexanol wurde hingegen lange Zeit vernachlässigt und es gibt bisher nur sehr wenig publizierte Arbeiten (166). Zwar wurde bereits 1975 die weitere Oxidation von Ethylhexanol über den entsprechenden Aldehyd zur Ethylhexansäure und durch  $\omega$ - und  $\omega$ 1-Oxidation bis hin zu 4- und 2-Heptanon mit 2-Ethyl-1,6-hexandicarbonsäure als Hauptmetabolit nachgewiesen. Diesen weiteren Metaboliten wurde jedoch zunächst keine Beachtung geschenkt. Erst viele Jahre später in den 90er Jahren gab es weitere Untersuchungen zum Metabolismus von 2-Ethylhexanol und 2-Ethylhexansäure, die als Intermediärprodukte für die Weichmacherindustrie und nun auch als Holzkonservierungsmittel und als Lösungsmittel und Klebstoffkomponente eingesetzt wurden (167). Abbildung 5 zeigt den Abbauweg von Ethylhexanol, wie er aus den Ergebnissen von Messungen in Rattenurin abgeleitet wurde. Diese Ergebnisse konnten später auch in vivo mit dem Nachweis von 2-Ethyl-1,6-hexandicarbonsäure als Hauptmetabolit im Urin von Arbeitern eines Sägewerkes (2-Ethylhexansäure Belastung) bestätigt werden (168;169).

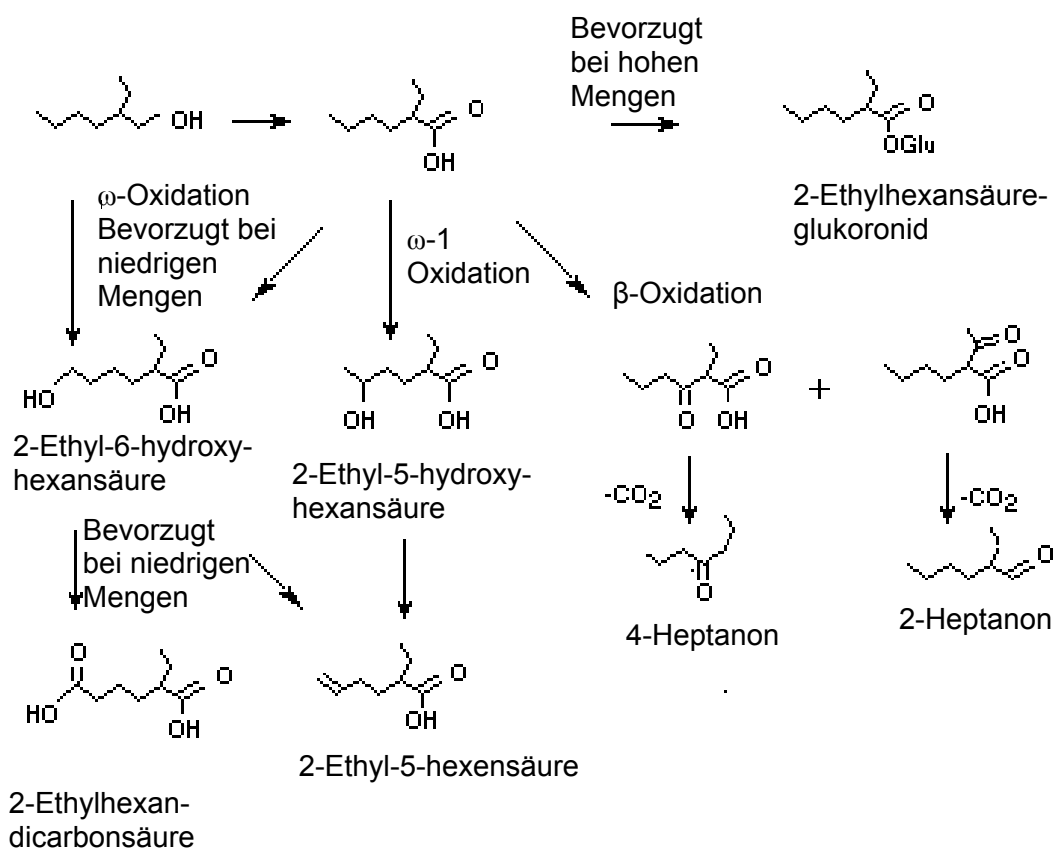


Abb. 5: Metabolisierung von Ethylhexanol in vivo

## 2.5 Analytik

### 2.5.1 Analytik von DEHP und DEHP-Metaboliten in humanem

#### Serum/Plasma

Methoden zur Bestimmung von DEHP bzw. der DEHP-Metabolite im Blut, Plasma oder Serum beschränken sich zumeist auf DEHP. Zur instrumentellen Analytik wurden die Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit UV-Detektion (HPLC-UV) oder die Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS) oder mit einem Elektroneneinfangdetektor (GC-ECD) verwendet. Eine HPLC-UV-Methode zur Bestimmung von DEHP im Plasma (und in Lösungen zur parenteralen Ernährung) unter Verwendung von Di-n-heptyl-phthalat als internem Standard beschreiben Kambia et al. ([170](#)). Die Extraktion des DEHP aus dem Plasma erfolgt mit Hexan unter Zusatz von Natronlauge und Acetonitril (zur Ausfällung der Proteine). Die Hexan-Extrakte werden bis zur Trockne eingeeengt und in Acetonitril wieder aufgenommen. Die Bestimmungsgrenze der Methode beträgt 20 µg/l (= 20 ng/ml) mit einer Wiederfindung von 97% und einer Vergleichspräzision von 9,5%. Ähnliche Aufarbeitungs- und Messmethoden publizierten Pollack et al. ([171](#)) zur Bestimmung von DEHP im humanen Vollblut und Asaoka et al. ([172](#)) im Blut von Affen. Eine GC-MS-Methode zur Bestimmung von Phthalsäureestern, unter anderem DEHP und MEHP beschreiben Colón et al. ([173](#)). Auch diese Autoren versetzen das Serum mit Acetonitril, extrahieren mit Hexan/Dichlormethan und verwenden diesen Extrakt dann ohne weitere Aufreinigung, jedoch nach Einengen, für die GCMS. Mit einer ähnlichen Aufarbeitung, aber unter Verwendung von GC-ECD bestimmten Sjöberg et al. ([174](#)) die Konzentrationen an DEHP und MEHP im Plasma Neugeborener, die eine Bluttransfusion erhalten hatten. Eine HPLC-MS-Methode (HPLC-ESI-MS-MS = Hochdruckflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer unter Verwendung der Elektrospray-Ionisation) zur Bestimmung von 9 Phthalat-Metaboliten im Serum, unter anderem MEHP, beschreiben Kato et al. ([175](#)). Nach Denaturierung der Proteine mit Phosphorsäure und Dotierung mit <sup>13</sup>C-markierten internen Standards werden die Proben mit β-Glucuronidase behandelt und die Phthalat-Metabolite an einer SPE-Kartusche angereichert. Sie werden mit Acetonitril und Ethylacetat wieder eluiert, die Eluate zur Trockne eingeeengt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und analysiert. Eine HPLC-MS-Methode publizierten auch Inoue et al. ([176](#)) zur Bestimmung von DEHP und MEHP im Blut,

wobei deuterierte interne Standards verwendet wurden und die Probenanreicherung mittels Säulenschalttechniken erfolgte. Grundsätzlich ist eine Serum- bzw. Blutanalytik der Phthalat-Monoester besonders kritisch zu beurteilen im Bezug auf eine exogene Kontamination, aber auch auf einen endogenen Abbau der Metabolite durch die Lipasen des Blutes (175).

### **2.5.2 Analytik von DEHP-Metaboliten im Humanurin**

Schon 1980 wurde von Draviam et al. (177) eine HPLC-Methode mit UV-Detektion zur Analytik von DEHP, MEHP und Phthalsäure, sowie weiteren Phthalaten im Humanurin veröffentlicht. Die Urinproben werden nicht hydrolisiert. DEHP und seine Metaboliten werden aus dem stark angesäuerten Urin mit Diethylether extrahiert, der Etherextrakt eingeeengt und zur HPLC-Analytik in Methanol wieder aufgenommen. Ein „Clean-Up“ ist nicht vorgesehen, die quantitative Bestimmung erfolgt über die UV-Absorption (bei 245 nm). Wegen der mangelnden Spezifität und der „schlechten“ Nachweisgrenze von über 1 mg/L für Phthalsäure, MEHP und DEHP können HPLC-UV-Methoden jedoch nicht zur Analytik der „Grundbelastung“ mit DEHP eingesetzt werden. Draviam et al. (178) verwendeten sie zur Bestimmung von DEHP, MEHP und Phthalsäure im Urin von Psoriasispatienten, Patienten, die wegen einer Urämie hämodialysiert wurden oder die sich einer Bypassoperation unterzogen hatten und deren Blut während der Operation mit einem Membranoxygenator oxygeniert worden war. Eine nicht für die Routine geeignete Methode zur Analytik konjugierter Metaboliten des DEHP im Urin von Meerschweinchen und Mäusen mit Hilfe der Gaschromatographie und der Fast-atom-bombardment-Massenspektrometrie (FABMS) beschrieben Egestad et al. (179). Sie stellen fest, dass neben den Glucuronsäurederivaten der DEHP-Metaboliten auch, allerdings in geringerem Umfang, Glucoside im Urin von Mäusen vorkommen. Eine Methode zur Bestimmung der Gesamtkonzentration an Phthalsäure und ihren Estern im Urin beschreiben Albro et al. (180). Bei Verwendung von 4-Chlorphthalsäure als internem Standard umfasst sie die Hydrolyse des Urins mit Natronlauge zur Freisetzung der Phthalsäure aus allen ihren Verbindungen und die Umsetzung zu Dimethylphthalat mittels Bortrifluorid-Methanol. Die Nachweisgrenze wird mit 0,5 nmol/ml angegeben (dies entspricht ca. 10 µg/l). Dabei werden Phthalsäure, sowie alle Phthalsäureester und die sich davon ableitenden Metaboliten (auch die glucuronidierten Formen) summenparametrisch erfasst. Die Autoren stellen nach Untersuchung von mehr als



200 Urinproben fest, dass keine Urinprobe frei von Phthalaten ist. Leider geben sie aber keine Konzentrationen an. Für die Analytik einzelner bestimmter Phthalsäureester ist die Methode von Albro et al. ungeeignet. Sollen spezifisch DEHP-Metaboliten gemessen werden, so sind folgende Schritte zur Probenaufbereitung erforderlich:

- a) enzymatische Hydrolyse mittels lipasefreier Glucuronidase/Sulfatase zur Spaltung der teilweise als Konjugate im Blut (Serum) vorliegenden und größtenteils als Konjugate im Urin ausgeschiedenen Phthalat-Metaboliten,
- b) Extraktion und „Clean-up“,
- c) Derivatisierung (eventuell ein nochmaliges „Clean-Up“) und
- d) instrumentelle Analyse.

Wird die Hochdruckflüssigkeitschromatographie als Trennmethode verwendet, so kann die Derivatisierung entfallen (181;182). In der Methode von Koch et al. (183) erfolgt der „Clean-up“ (Schritt c) nach enzymatischer Hydrolyse automatisiert in einem Online-Verfahren eingebunden in die instrumentelle Analyse (Schritt d).

Spezifische Analysemethoden zur Bestimmung von Phthalat-Metaboliten im Urin umfassen:

A: Gaschromatographie-Massenspektrometrie:

- MEHP und Metaboliten V, VI und IX: Dirven et al. (184),
- MEHP und Metaboliten I, IV, V, VI, X und weitere: Schmid und Schlatter (185).

B: Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie

- MEHP (und andere Phthalsäuremonoester): Anderson et al. (186), Blount et al. (187), Hoppin et al. (188), Silva et al. (189),
- MEHP (inkl. Monoctylphthalat, MEHP und Monocotylphthalat wurden chromatographisch nicht getrennt): Anderson et al.,
- MEHP und Metabolite VI und IX so wie andere Phthalat-Monoester: Koch et al. (190), Barr et al. (191),
- MEHP und Metabolite IV, V, VI und IX: Preuss et al. (192).

Nur die Sekundärmetabolite des DEHP können im Urin (und auch im Blut) kontaminationsfrei gemessen werden. Der Monoester MEHP kann durch diverse hydrolytische Prozesse bereits in der präanalytischen Phase oder unter Umweltbedingungen leicht aus DEHP gebildet werden. Dies trifft auf die Sekundärmetabolite nicht zu. Da DEHP-Kontaminationen nie auszuschließen sind, sind auch Kontaminationen mit MEHP immer möglich.

## **3. Material und Methoden**

### **3. 1 Weichmacheranalytik**

Im Kapitel Einleitung sind bereits verschiedene Analyseverfahren angesprochen worden, keine davon wurde jedoch bislang für die simultane Analyse von DEHP, sowie seiner Metabolite MEHP, Phthalsäure, Ethylhexanol und Ethylhexansäure in der Routineanalytik eingesetzt. Momentan fehlt es an einer geeigneten Methode. Zur Entwicklung der selben stehen zwei GC-MS-Systeme der Kategorie HP5890 von Agilent zur Verfügung. Das erste System ist mit einem HP 7673 A Autosampler ausgerüstet, für das zweite stehen eine Thermodesorptionseinheit mit Autosampler und ein Multipurposesampler für die Headspaceanalyse von gasförmigen Proben, jeweils mit Kaltaufgabesystem CIS-3 der Firma Gerstel zur Verfügung.

Die Entwicklung einer simultanen Analysenmethode umfasst die folgenden Unterpunkte:

#### **3.1.1 Auswahl der internen Standards**

Da für jede Substanzgruppe ein eigener interner Standard für die Quantifizierung notwendig ist, werden für diese Analyse drei interne Standards benötigt. Die Auswahl der jeweiligen Standards wird im Ergebnisteil genauer erläutert.

#### **3.1.2 Entwicklung der Extraktionsmethode**

#### **3.1.3 Auswahl der Derivatisierung**

Einige der Metabolite können ohne eine Derivatisierung nicht gaschromatographisch getrennt werden.

#### **3.1.4 Trennung und Detektion**

Für eine gute gaschromatographische Trennung können die folgenden Parameter optimiert werden:

- Säulenmaterial
- Säulenlänge
- Temperaturprogramm
- Trägergasfluss

Die Detektion der Metabolite wird mittels HP 5971 Massendetektor durchgeführt. Die Ionisation erfolgt mittels Ionenstoß bei 70 eV Spannung. Die Detektion erfolgt im Positiv-Ion-Mode. Alle Metabolite werden zunächst im Scanmode einwandfrei

identifiziert (siehe Abbildung 13). Danach werden für jeden Analyten ein Quantifier- (zumeist das Ion mit der höchsten Intensität) und ein zusätzliches Identifier-Ion mit einem definiertem Verhältnis zum Quantifier-Ion ausgewählt. Abweichungen von diesem Verhältnis können als Hinweis für das mögliche Vorhandensein von Störsubstanzen gedeutet werden. Die spätere Quantifizierung erfolgt aufgrund der höheren Sensitivität im Single-Ion-Mode. Eine Liste der entsprechend ausgewählten Ionen ist Tabelle 10 zu entnehmen.

#### 3.1.5 Kalibration der Methode

#### 3.1.6 Bestimmung der Präzision

#### 3.1.7 Wiederfindung

#### 3.1.8 Leerwertbestimmung

Ein großes Problem bei der Bestimmung präziser Weichmacherkonzentrationen stellen die ubiquitären Belastungen aller Lösungsmittel und Arbeitsgeräte dar. Als Konsequenz kam es häufiger zu falsch hohen Angaben über DEHP Gehalte wie zum Beispiel in der Ozeanluft (193). Bisher wurde daher sehr viel Wert auf eine möglichst kontaminationsfreie Analytik gelegt und verschiedene Reinigungsschritte vorgeschlagen: Die aufwendigste Reinigung sah eine Spülung zuerst mit Reinigungslösung, dann mit destilliertem Wasser und destilliertem Aceton vor. Danach erfolgt eine Trocknung über 10 Stunden bei 320°C im Ofen und anschließende Abkühlung unter Luftausschluss zur Vermeidung von Verunreinigung durch Staubpartikel in der Luft. Als Letztes erfolgte noch eine Spülung mit Petroleumether (194). Bei all diesen Reinigungsschritten kann jedoch nie eine Restbelastung ausgeschlossen werden.

Da es sich bei den meisten Punkten um eine Neuentwicklung und nicht um ein bereits beschriebenes Verfahren handelt, werden sie im Abschnitt „Ergebnisse“ unter 3.1 Serumanalytik und 3.2 Urinanalytik genauer aufgeführt.

### 3.2 Klinische Studien zur Weichmacherbelastung im Serum von chronischen Dialysepatienten

Dialysepatienten wird seit jeher große Aufmerksamkeit in Bezug auf ihre Belastung mit verschiedenen Weichmachern aufgrund ihres regelmäßigen und andauernden Kontakts mit Weichmacher-haltigen medizinischen Verbrauchsmaterialien entgegengebracht. Sie zählen zu der Personengruppe der am höchsten Weichmacherbelasteten und sind daher für die Evaluierung der analytischen DEHP-Bestimmung besonders geeignet. Für die Studie wurden 50 Serumproben von Patienten des Dialysezentrums Fulda zur Verfügung gestellt. Als Referenzgruppe dienen gesunde freiwillige Probanden aus dem Bereich des Zentrallabors. Die Proben werden gemäß dem unter 4.1. beschriebenen entwickeltem Verfahren zur Serumanalytik aufgearbeitet und gemessen. Von den erhaltenen Messwerten wird anschließend der unter 4.1.6 ermittelte Leerwert abgezogen.

<b>Parameter</b>	<b>Dialysepatienten</b>	<b>Kontrollgruppe</b>
<b>Anzahl</b>	<b>50</b>	<b>20</b>
<b>Männlich</b>	<b>27</b>	<b>10</b>
<b>Weiblich</b>	<b>23</b>	<b>10</b>
<b>Alter</b>	<b>67,8 ± 12,2 Jahre</b>	<b>38,3 ± 17,4 Jahre</b>
<b>Dialysedauer</b>	<b>5,2 ± 4,1 Jahre</b>	<b>--XXX--</b>

***Tabelle 5: Parameter der Versuchsgruppen***

### **3.3 Molekularbiologische Untersuchungen**

#### **3.3.1 Zeitabhängige Stimulation von Jurkat E6.1 Zellen mit DEHP**

Zur Beurteilung möglicher Einflüsse von DEHP auf die Reaktivität immunologischer Zellen werden die T-Lymphocyten-Zelllinie Jurkat E6.1 zeitabhängig mit DEHP stimuliert. Die Zellen (ca.  $3 \times 10^6$  Zellen/Well in 5 mL Medium) werden in 6-well-Platten ausgesät, 24 Stunden inkubiert und anschließend mit 100  $\mu\text{mol/L}$  DEHP in DMSO zeitabhängig für 2,3,4,6,24 und 48 Stunden stimuliert. Die Konzentration wird so gewählt, dass die DMSO-Konzentration im Medium bei 2% liegt. Als Kontrolle dient eine mit DMSO stimulierte Probe. Alle Stimulationen erfolgen in Doppelbestimmung.

#### **3.3.2 RNA-Aufreinigung aus einer Zellkultursuspension und DNase-Verdau**

Die Aufreinigung von RNA aus einer Einzellsuspension wird mittels eines RNA-Midikit der Firma Invitrogene (Karlsruhe, D) gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt. Um die RNA-Probe von verunreinigender DNA zu reinigen wird nach der RNA-Aufreinigung ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wird nach der RNA-Aufreinigung 70  $\mu\text{L}$  der gewonnenen RNA-Lösung mit 1  $\mu\text{L}$  DNase und 7  $\mu\text{L}$  Pufferlösung (Invitrogene, Karlsruhe, D) versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

#### **3.3.3 RNA-Quantifizierung**

Der RNA-Gehalt einer 1:100 verdünnten Probe wird durch eine Absorptionsmessung mittels Gene Quant II (RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgt mittels Dreifachmessung mit 5 Sekunden Absorptionszeit.

#### **3.3.4 Reverse Transkription**

Durch die Reverse Transkription wird die aufgereinigte RNA als Matrize für die Synthese eines cDNA-Stranges verwendet, der als Produkt aus der Reaktion hervorgeht. Dazu werden zu 1  $\mu\text{g}$  RNA (Probe) und 0,25  $\mu\text{L}$  Hexanukleotide als Primer (Random Hexamers, Promega, Mannheim, D) in ein RNase-freies Reaktionsgefäß gegeben und der Reaktionsansatz bis zu einem Endvolumen von 12  $\mu\text{L}$  mit RNase freiem Wasser aufgefüllt. Dieser Reaktionsansatz wird dann für 5

Minuten bei 70°C und danach für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Diesem werden danach 5 µl M-MLV RT 5-fach Reaktionspuffer (Promega, Mannheim, D), 1, 25 µl 10 mM dNTP's (PCR Nucleotide Mix, Promega, Mannheim, D), 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (H-) (200 U) (Promega, Mannheim, D), 1 µl DTT (Promega, Mannheim, D), 1 µl RNasin (Promega, Mannheim, D) und 3,75 µl RNase freies Wasser hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wird zunächst für 10 Minuten bei RT, danach für 50 Minuten bei 42°C und abschließend für 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Danach wird 1 µl RNase H (3 U) (Invitrogene, Karlsruhe, D) hinzugefügt. Der RNA-Verdau wird für 20 Minuten bei 37°C durchgeführt.

### **3.3.5 Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die Quantifizierung der relativen Expression der Transkriptionsfaktoren PPAR, Gata-3, t-bet und Δ6-desaturase werden mittels Light Cycler System (Roche, Mannheim, D) durchgeführt. Dazu werden 0,5 µg DNA Probe als Matrize für die PCR verwendet. Diesem werden 10 µl 2-fach QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix sowie 1 µl 0,5 µM Forward bzw. Reward Primer (Metabion, Planegg-Martinsried, D) für die entsprechenden Gensequenz der Transkriptionsfaktoren hinzugefügt. Insgesamt werden zur Analyse 45 Zyklen durchgeführt. Dabei beträgt die Denaturierungstemperatur 94°C, die Annealingtemperatur 55°C und die Extensionstemperatur 72°C.

### 3.3.6 Übersicht der verwendeten Primer

Alle verwendeten Primer wurden mit Hilfe des im Internet frei verfügbaren Programms „Primer3“ (195) ausgewählt. Berücksichtigte Primereckdaten sind ein GC-Gehalt von 50%, eine Primerlänge von 20 Basenpaaren, eine Produktlänge von 100-150 Basenpaaren und einer Schmelztemperatur von 60°C. Tabelle 6 zeigt die Übersicht der verwendeten Primer.

Sequenzname	3'-Primer	5'-Primer
PPAR $\alpha$	atcagccacacctttccag	gccggttacctacagctcag
PPAR $\gamma$	gctggcctccttgatgaata	ttgggctccataaagtcacc
PPAR $\gamma$ 2	cctcacagctgttgccaag	tcctttagatctcctgcag
hgata3	gccgtcttgatactttcaga	tttaacatcgacgggtcaagg
tbet	ttggtgtggactgagattgc	gctgtcaccactggaaggat
VCAM	catggcgttcttagttggt	gaacgccactgtccctcta
$\Delta$ 6-desaturase	gattgagcaccacctcctcc	ctggacgcctaccttcacaa

Tabelle 6: Für die Real-Time PCR verwendete Primersequenzen

Die Gründe für die Auswahl der entsprechenden Transkriptionsfaktoren werden im Diskussionsabschnitt ausführlich erläutert.



### **3.3 Tierexperimentelle Untersuchungen**

#### **3.3.1 Versuchstiere und Tierhaltung**

Für die in-vivo Studien wurden, sowie nicht anders beschreiben, weibliche BALB/c-, bzw. C57Bl6-Mäuse (Harlan Winkelmann, Borchelt, D) im Alter von 6-8 Wochen verwendet. Sämtliche Tiere wurden unter keimarmen Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigen bei konstanter Raumtemperatur (RT) von 20°C und konstanter Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Tiere erhielten ovalbuminfreies Wasser und Futter ad libidum. Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden durch das Regierungspräsidium Giessen durch den Antrag V54-19 c 20/15 (1) MR 20/13 Nr. 55/2004 „Mögliche Auswirkungen von Phthalaten und Phthalatmetaboliten auf den Organismus“ genehmigt. Die ethische Abwägung der Versuche erfolgte anhand der von Scharmann und Teutsch formulierten Richtlinien (196).

#### **3.3.2 Protokolle zur Induktion einer Atemwegsreaktion**

Als Basis aller in-vivo Studien dient ein auf Aerosolexposition der Weichmacher basierendes Tiermodell. In dieser Arbeit wurden für verschiedene Fragestellungen drei Varianten verwendet. Die erste Variante ist ein Kurzzeitexpositionsmodell des reinen Weichmachers, um so die direkte Chemikalienwirkung zu beurteilen. Ausgehend von diesem Modell wurde im zweiten Versuch versucht diese Reaktion zu blockieren. Bei der dritten Variante handelt sich um das Standard-Modell für das allergische Asthma, in dem eine allergische Entzündungsreaktion in der Lunge in Verbindung mit der Entwicklung einer Atemwegsüberempfindlichkeit induziert wird und der modulierende Effekt des Weichmachers auf diese Reaktion dokumentiert werden soll.

##### **3.3.2.1 Induktion einer Atemwegsreaktion durch Kurzzeitexposition mit DEHP**

Die akute Reaktion des Weichmachers wird im Mausmodell durch eine Aerosolexposition ausgelöst. Dazu werden weibliche BALB/c-Mäuse an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils zwanzig Minuten lang mit verschiedenen Weichmacherkonzentrationen (250 – 2000 µg/mL) exponiert. Das Aerosol wird dabei von einem Generator (PARI® Master, Pari, Starnberg, D) gebildet. Die Analyse der Tiere findet 24 Stunden später statt.

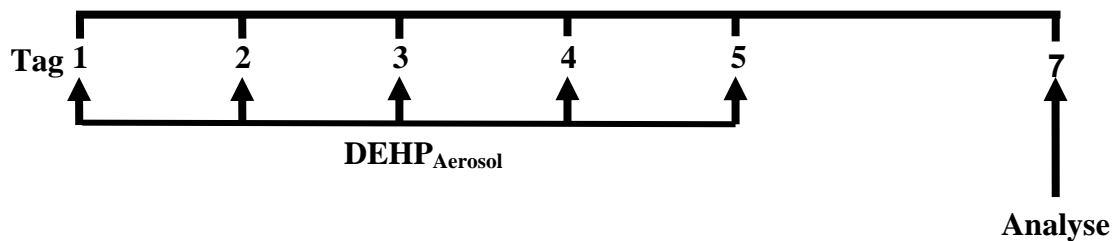


Abb. 6: Protokoll zur DEHP Provokation und Analyse einer möglichen Atemwegsentzündung

### 3.3.2.2 Verstärkung der Reaktion an NGF-transgenen Mäusen

Zur Klärung der Frage, ob die im ersten Versuch beobachtete Lungenreaktion auf die Reizung durch den Bronchokonstruktor (siehe Ergebnisteil) NGF-abhängig ist, werden NGF-überexprimierende Tiere (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. C. Hahn, klinische Chemie, Uni Marburg) analog dem Protokoll des ersten Versuches mit PBS bzw. 2000 µg/mL DEHP behandelt. Als Kontrollgruppe dienen in diesem Fall C57Bl6-Mäuse, da die Transgenen-Mäuse genetisch einen Bl6-Hintergrund besitzen.

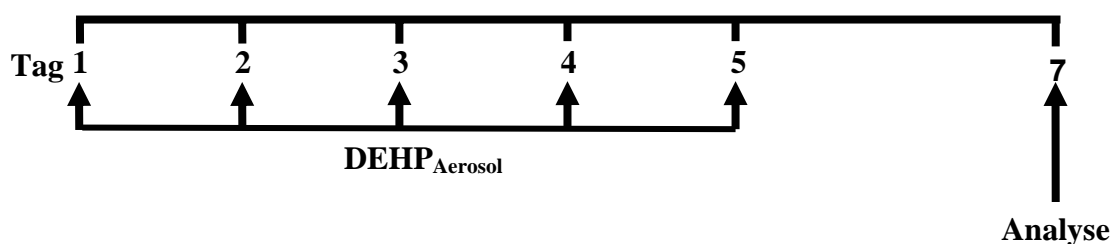


Abb. 7: Protokoll zur DEHP Provokation und Analyse einer möglichen Atemwegsentzündung an NGF-transgenen Tieren

### 3.3.2.3 Blockieren der Reaktion durch die Gabe eines NGF-Antiserums vor der Exposition

In einem weiteren Proof-of-Concept-Experiment soll untersucht werden, ob die durch DEHP ausgelöste Reaktion der Lunge durch die Gabe eines NGF-Antiserums vor

der Exposition unterdrückt werden kann. Die Exposition der Tiere erfolgt analog der vorangegangenen Experimente. Je eine PBS- und DEHP-Gruppe werden drei Stunden vor der Exposition mit einem polyclonalen Rabbit anti-Mouse Antiserum behandelt. Dazu werden die Gruppen zunächst durch intraperitoneale Injektion eines Ketanest (Parke-Davis)/Rompun (Bayer, Leverkusen)-Gemischs (150µL) anästhesiert. Die Narkose tritt nach ca. 3-5 Minuten auf und hält 10- 30 Minuten an. In dieser Zeit werden die Tiere intranasal mit je 200 µL behandelt. Die Analyse der Tier findet 24 Stunden nach der letzten Exposition statt.

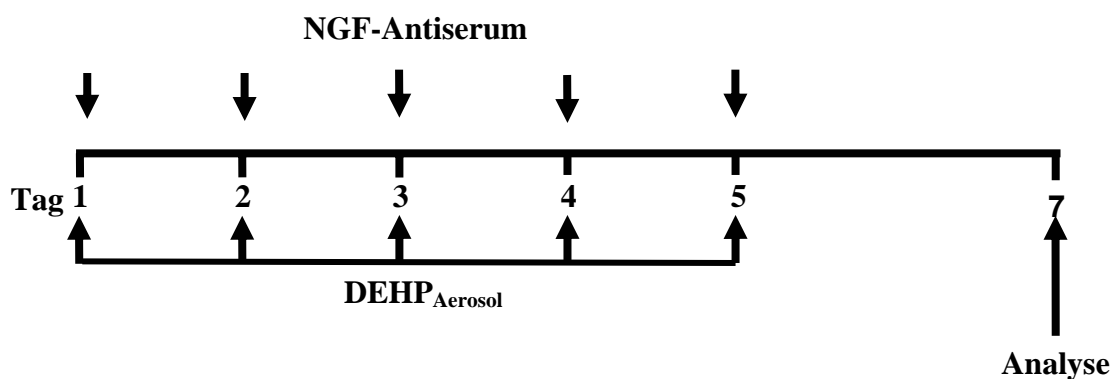


Abb. 8: Protokoll zur DEHP Provokation und Versuch der Unterdrückung einer Atemwegsentzündung

### 3.3.2.4 Verstärkung einer akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge und Immunmodulation während der Sensibilisierungsreaktion

Die Sensibilisierung gegen ein Protein ist die Grundvoraussetzung für die Etablierung einer lokalen Entzündungsreaktion in der Lunge. Diese Sensibilisierungsreaktion wird im Maus-Modell durch drei intra-peritoneale (i.p.) Injektionen des artfremden Proteins 10 µg Ovalbumin (OVA Grade VI, Sigma, Stainheim, D) gelöst in 100 µl PBS an den Tagen 1, 14 und 21 des Versuchsprotokolls (Abbildung) in Verbindung mit 100 µl Adjuvans Aluminiumhydroxyd (Al(OH)<sub>3</sub>) (Inject Alum, Pierce, USA) ausgelöst. Die systemische Applikation des Ovalbumins führt zur Bildung von OVA-spezifischen TH<sub>2</sub>-Zellen. Der Sensibilisierungserfolg lässt sich später durch den Nachweis einer Produktion von OVA-spezifischen Antikörpern der Subklassen IgE und IgG<sub>1</sub>, die unter dem Einfluss von TH<sub>2</sub>-Zytokinen gebildet werden, feststellen.

An den Tagen 26-31 werden die Tiere in einer luftdichten Expositionskammer für 20 Minuten einer OVA-Lösung (1% OVA Grade V gelöst in PBS), versetzt mit steigenden Konzentrationen an Weichmacher (250 – 2000 µg/mL) ausgesetzt

wodurch ein Antigenkontakt in der Lunge ausgelöst wird, der die lokale Entzündungsreaktion initiiert. Das Aerosol wird dabei von einem Generator (PARI® Master, Pari, Starnberg, D) gebildet. Die Analyse der Tiere findet 24 Stunden später statt.

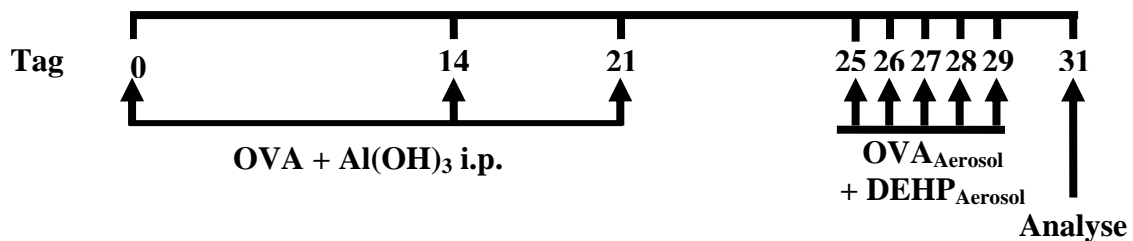


Abb. 9: Protokoll zur allergischen Sensibilisierung, Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung und Immunmodulation durch DEHP während der Sensibilisierungsphase

### 3.3.3 Messung der Atemwegsreagibilität gegenüber $\beta$ -Methyl-Acetylcholin (MCh)

Die Head-out Body-Plethysmographie ermöglicht die Messung verschiedener Lungenfunktionsparameter, wie den halbmaximalen expiratorischen bzw. inspiratorischen Atemfluss, das Atemzugvolumen, die Expirations- bzw. Inspirationszeit, sowie Atemfrequenz am spontan atmenden, nicht-anästhesierten Tier. Als Basis für die Berechnung dieser Parameter dient der expiratorische bzw. inspiratorische Atemfluss, der aus einer atmungsbedingten Druckveränderung innerhalb eines Head-out Body-Plethysmographen abgeleitet wird. Während der Messung wird MCh als Acetylcholin-Derivat benutzt, um eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur zu induzieren. Dies bewirkt eine Erhöhung des Atemwegswiderstands und somit eine Verringerung des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses ( $EF_{50}$ ). Letztlich wird die MCh-Konzentration ermittelt, die eine 50%ige Reduktion des Ausgangswerts des halbmaximalen expiratorischen Atemflusses bewirkt ( $MCh_{50}$ ).

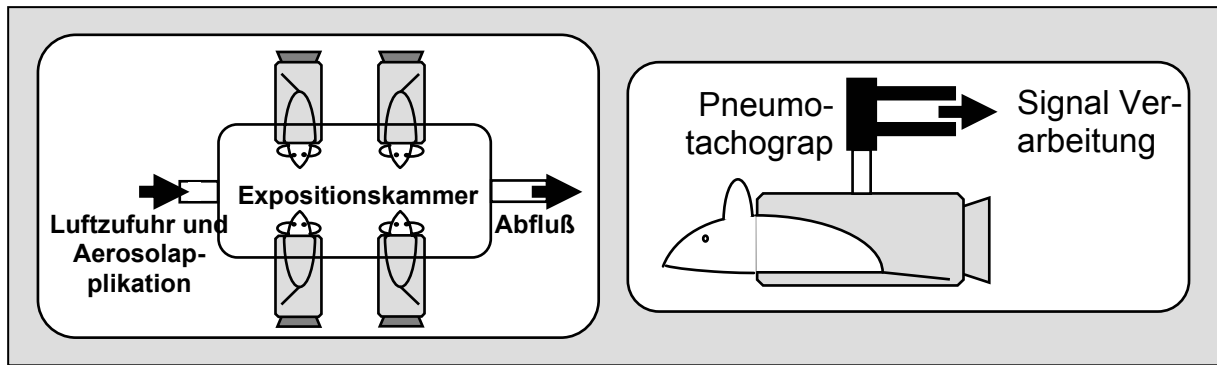


Abb. 10: Aufbau der Messkammer zur Bestimmung der Atemwegsreaktion nach Methacholinprovokation

Zu Beginn einer jeden Messung wird zunächst 15 Minuten lang die so genannte Baseline  $X \pm SD$  für den  $EF_{50}$  ermittelt. In diesen 15 Minuten atmet die Maus ungefähr 4000 Mal ein und aus. Alle während dieser Messperiode aufgenommenen Werte werden gemittelt und für jeden dieser Mittelwerte wird der Wert 100 festgelegt. Somit werden entsprechende Veränderungen gegenüber diesen Kontrolldaten als prozentuale Abweichungen von der Baseline erfasst. Anschließend wird alle 5 Minuten für jeweils 70 Sekunden eine MCh-Lösung ( $\beta$ -Methyl-Acetylcholin, Sigma, Steinheim, D) in aerosoler Form in die Expositions-kammer geleitet, während die Lungenfunktionsparameter weiterhin kontinuierlich aufgenommen werden. Dabei werden folgende Konzentrationen von MCh in PBS in aufsteigender Reihe verwendet: 0 mg/ml, 12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml und 125 mg/ml.

### 3.3.4 Gewinnung von Serumproben

Vor der eigentlichen Blutentnahme werden die zu untersuchenden Tiere etwa 10 Minuten in einen Wärmeinkubator bei 60°C eingebracht, um eine Dilatation der peripheren Gefäße herbeizuführen. Anschließend wird durch einen Schnitt die Schwanzvene eingeringt und das entweichende Blut aufgefangen. Das maximal zu entnehmende Blutvolumen beträgt 500  $\mu$ l. Danach werden die Blutproben bei RT für 3 Stunden inkubiert, bis dass das Blut vollständig geronnen ist. Die Proben werden dann für 20 Minuten bei 2000g und RT zentrifugiert und anschließend der Serumüberstand abgenommen. Dieser kann bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert werden.

### **3.3.5 Broncho-alveoläre Lavage**

Die broncho-alveoläre Lavage (BAL) dient der Gewinnung von Zellen, die in das broncho-alveoläre Lumen infiltriert sind. Ferner werden Proteine, die sich in diesem Kompartiment befinden, ausgewaschen. Zunächst wird am durch zervikale Dislokation getöteten Tier die Trachea freigelegt. In diese wird eine kleine Öffnung geschnitten, und eine Spritzennadel eingeführt. Über diese Nadel wird 2 x 0,8 ml eiskaltes PBS (PAA, D) mit einem Protease-Inhibitor complete™ Mini, (Roche, Mannheim, D) in die Lunge appliziert und direkt wieder entnommen. Die Suspension wird im Anschluss für 5 Minuten bei 500 g und 4°C zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wird danach abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

### **3.3.6 Zellzählung und Zelldifferenzierung in der broncho-alveolären Lavage**

Die Bestimmung der Zellzahl in der BAL wird mittels CASY® TT Zellzählsystem (Schärfe System, Reutlingen, D) an 1:2000 verdünnten Proben durchgeführt.

Zur Differenzierung der Leukozyten in der BAL wird 50 µl Probe zunächst mit 150 µl PBS verdünnt und anschließend eine Zytozentrifugation für 5 Minuten bei 320 g durchgeführt (Zytozentrifuge Cytospin 3, Shandon, Frankfurt, D), wobei die in der Probe befindlichen Zellen auf einen Objektträger (76 mm x 26 mm, Matrand, Marienfeld, D) zentrifugiert werden. Die Präparate werden anschließend 30 Minuten getrocknet und dann mit einer Diff-Quick®-Lösung (Dade-Behring, Marburg, D) gefärbt. Die Zelldifferenzierung erfolgt lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung anhand morphologischer Kriterien.

### **3.3.7 Lungenhistologie**

Eine histologische Untersuchung der Lunge wird nur an Tieren vorgenommen, die vorher keiner broncho-alveolären Lavage unterzogen worden sind. Zur Analyse einer erfolgten Schädigung der Lunge, werden diese über die Trachea mit 4% Formaldehyd in situ fixiert. Anschließend wird die Lunge entfernt und in 4% Formaldehyd gelagert und nach 24 Stunden in Paraffin eingegossen. Aus diesen Proben werden Dünnschnitte von 3µm Dicke hergestellt (Accu-Cut® SRM™ 200 rotary microtome, Sakura, J).

Entparaffinierte Schnitte werden mit Hämatoxin (Hämatoxin II nach Gill, Merck, Darmstadt, D) und Eosin (Eosin G, Merck) gefärbt, um anhand dieser Schnitte einen Gesamtüberblick über den histologischen Aufbau und eventuelle Veränderungen zu gewinnen.

Um eine vermehrte Mukusproduktion in den Atemwegen nachweisen zu können, werden weitere Schnitte einer Period-Schiff-Färbung (PAS-Färbekit, Merck) unterzogen. Die Gegenfärbung dieser Schnitte erfolgt mit Hämatoxin.

Das Neurotrophin NGF (NerveGrowthFactor) wird mit Hilfe einer Zwei-Schritt indirekten immunhistologischen Färbung aus den paraffinierten Präparaten nachgewiesen. Bei dieser Methode bindet zuerst ein unkonjugierter (unmarkierter)

*Primärantikörper* an das Antigen. Anschließend wird ein zweiter enzymmarkierter *Sekundärantikörper* aufgetragen, der gegen den Primärantikörper (jetzt das Antigen) gerichtet ist (Abb. 3.6). Danach folgt die Substrat-Chromogenreaktion. Diese Methode ist flexibler als die direkte Methode, da eine Vielzahl von Primärantikörpern aus *einer* Spezies mit dem gleichen konjugierten Sekundärantikörper kombiniert werden können. Die *indirekte (oder 2—Schritt-) Methode* ist zudem auch höher sensitiv, da sehr wahrscheinlich mehrere Sekundärantikörper mit verschiedenen Epitopen des Primärantikörpers reagieren und daher das Signal verstärkt wird (mehr Enzymmoleküle binden am Ort des Antigens).

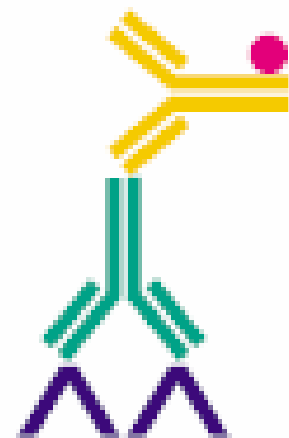


Abb. 11: 2-Schritt indirekte Methode.  
Ein enzymmarkierter Sekundärantikörper reagiert mit einem unkonjugierten Primärantikörper, der an ein Gewebeanigen gebunden ist.

Nach dem Waschen der Präparate werden sie über Nacht mit 5% Rattenserum in 1%iger BSA-Lösung bei 4°C blockiert. Am nächsten Tag werden die Schnitte zunächst mit einem Avidin-, danach mit einem Biotin-Block behandelt. Nach einem Waschschrift mit PBS erfolgt die Inkubation mit 1:200 verdünntem Rabbit anti-rat polyclonalem IgG NGF (M-20) Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, San Antonio, USA) für eine weitere Nacht bei 4°C. Am letzten Tag erfolgt nach der Inkubation mit einem biotiniliertem Rat anti-Rabbit Sekundärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur, die Farbentwicklung durch Auftragen von LSAB-Lösung (20 Minuten) und dem Verctor Kit AP blue gemäß Anleitung des Herstellers (30 Minuten, alles bei Raumtemperatur). Die Gegenfärbung erfolgt mit Vector Fast Red.

Sämtliche Schnitte werden nach der Trocknung an der Luft mit einem Eindeckmedium auf Phenolbasis (Histomount mounting solution, Zymed Laboratories, San Francisco, USA) eingedeckelt.

### **3.3.8 Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinen aus Serum mittels Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**

Die Serumkonzentration der OVA-spezifischen Immunglobuline ( $\text{OVA}_{\text{spec}}$  Ig) der Subklassen IgE, IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2a</sub> werden mittels Sandwich-ELISA gemessen. Hierzu wird zunächst eine Flachboden-Mikrotiterplatte (MaxiSorp™ Surface, 96 Kavitäten, Nunc, Roskilde, DK) mit einer OVA-Lösung (OVA Grade VI, 20 mg/ml PBS, 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>) beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Lösung wird verworfen und die Platte dreimal mit Waschpuffer (PBS mit 0,1% TWEEN (Merck, Darmstadt, D)) gewaschen. Die übrigen Bindungsstellen werden mit einem Block-Puffer (PBS mit 3% Bovinem Serum Albumin (BSA), Sigma, Stainheim, D) in einer 3-stündigen Inkubation bei RT abgesättigt. Im nächsten Schritt werden die Serumproben entsprechend der zu messenden Ig-Subklassen verdünnt (für  $\text{OVA}_{\text{spec}}$  IgE 1:20, für  $\text{OVA}_{\text{spec}}$  IgG<sub>1</sub> 1:1000 und für  $\text{OVA}_{\text{spec}}$  IgG<sub>2a</sub> 1:500 000) und von dieser Verdünnung sowie von den Ig-Standards (Standard-Mausserum, Anti-OVA IgG<sub>1</sub> bzw. Anti-OVA IgG<sub>2a</sub>, Pharmingen, Hamburg, D), 50 µl aufgetragen. Die Ig-Standards werden in folgenden Konzentrationen aufgetragen: Anti-OVA IgE 8-1000 LU, Anti-OVA IgG<sub>1</sub> 88 pg/ml - 88 ng/ml, Anti-OVA IgG<sub>2a</sub> 88 pg/ml - 88 ng/ml. Im Anschluss wird erneut bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen werden 50 µl biotinylierte Anti-Maus IgE-, Anti-Maus IgG<sub>1</sub>- bzw. Anti-Maus IgG<sub>2a</sub>-Antikörper (2,5 µg/ml, Anti-Maus IgE, Anti-Maus IgG<sub>1</sub> bzw. Anti-Maus IgG<sub>2a</sub>, biotinyliert, Pharmingen, Hamburg, D) hinzugegeben und für 2 Stunden bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Auf erneutes dreimaliges Waschen folgt die Hinzugabe von 50 µl Streptavidin-Peroxidase-Lösung (1:1000 in PBS, Sigma, Stainheim, D). Die Platte wird danach für 30 Minuten bei RT auf einem Schüttler inkubiert, bevor 100 µl POD-Substratlösung (BM blue POD Substrate, Roche, Mannheim, D) aufgetragen werden. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT und unter Lichtausschluss wird die eintretende Farbreaktion mit dem Hinzufügen von 50 µl 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, D) gestoppt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt photometrisch bei 450 nm in einem Absorptionsphotometer (Tecan Sunrise, Salzburg, A). Die Auswertung der Analyse erfolgt mit Hilfe der Photometersoftware Magellan 2 (Tecan, Salzburg, A).



### **3.3.9 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen in der bronchoalveolaren Lavage mittels Cytometric Bead Array (CBA)**

Die Konzentration verschiedener Zytokine in BAL-Proben wurde mittels CBA-Technik bestimmt. Dabei wurden ein kommerziell erhältliche Kit BD™ Th1/Th2 Cytokine Kit (IL-2, IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) verwendet. Als Zytokinstandards wurden neun Verdünnungen im Bereich von 20 – 5000 pg/ml genutzt.

Die Grundlage für die Messung dieser verschiedenen Zytokine bilden fünf verschiedene Arten von Latexpartikeln, die bei Anregung mit einem Laser (488 nm) eine unterschiedliche Fluoreszenzintensität zeigen. Jeder der fünf Partikelarten ist zudem mit einem Primärantikörper beschichtet, der ein bestimmtes Zytokin spezifisch bindet. Nach der Zugabe der Proben bzw. der verschiedenen Zytokinstandards wird ein zweiter PE-konjugierter Antikörper hinzugefügt. Die Probelösung wird dann mittels FACScan (Becton Dickinson, USA) und Becton Dickinson CBA Software ausgewertet. Die Anregung durch den Laser ruft bei jedem Partikel, der eines der fünf Zytokine spezifisch an seiner Oberfläche gebunden trägt, zwei Fluoreszenzsignale hervor: zum einen lassen sich aufgrund der Antikörperspezifität und der Eigenfluoreszenz der Partikel die Zytokine diskriminieren, zum anderen kann anhand der PE-Fluoreszenzintensität der gebundenen Sekundärantikörper auf die Konzentration der verschiedenen Zytokine geschlossen werden. Die Analyse wird gemäß Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### **3.3.10 Extraktion und Derivatisierung der Fettsäuren aus Serumpoben**

Die Aufarbeitung der Serumproben erfolgte nach der nachfolgend beschriebenen Methode von Liebich et al. ([197](#)), die auf eine der Methode von Lepage ([198](#)) basiert. Dazu wurden 100  $\mu$ l Serum mit 2 ml einer Methanol-Toluol-Lösung (4:1) versetzt. Als interner Standard diente 13,16,19-Docosatriensäure in einer Konzentration von 20  $\mu$ g/mL. Die Lösung wurde für 60 min bei 100°C im Heizrührer inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 5 mL 6%ige Kaliumcarbonatlösung gestoppt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 1800g wurde die Toluolphase abgenommen und zur Messung in GC-Vials mit 100 $\mu$ L Mikroeinsätzen gefüllt. Die so

aufgearbeiteten Proben wurden bis zur gaschromatographischen Bestimmung bei -40°C eingefroren.

### **3.3.11 Gaschromatographische Analyse**

Die gaschromatographische Trennung der Fettsäuren erfolgte an einem HP5890 Serie II Gaschromatograph von Agilent mit angeschlossenem 5972 Massendetektor und Autosampler.

1 µl der Probenlösung wurde im Splitless-Modus auf eine RT 2560 Kapillarsäule mit 100m Länge 0,25mm Durchmesser und 0,25µm Innenbeschichtung aufgetragen. Als Trägergas diente Helium mit einem Vordruck von 40kPa.

### **3.3.12 Bestimmung von Leukotrien<sub>B<sub>4</sub></sub> aus Serum und BAL mittels Enzym-Immuno-Assay (EIA)**

Die Bestimmung von Leukotrien<sub>B<sub>4</sub></sub> erfolgte mittels eines Enzym-Immuno-Assay-Kits der Firma Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, USA) gemäß den Angaben des Herstellers. Ähnlich wie bei der Durchführung eines ELISA wurden die einzelnen Kavitäten der EIA-Platte mit 50 µl Probe bzw. Standard, 50 µl Leukotrien B<sub>4</sub> AChE Tracer und 50 µl Leukotrien B<sub>4</sub> Antiserum befüllt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dem Waschen der Platte wurde die Farbreaktion durch Zugabe von je 200 µl Ellman's-Reagenz pro Kavität ausgelöst. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden unter Lichtausschluss konnte die Platte bei 405 nm am ELISA-Photometer ausgelesen werden.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Serumanalytik**

Ziel der Methodenentwicklung ist eine simultane, schnelle und leicht durchzuführende Routineanalytik von DEHP und seiner wichtigsten Metabolite. Zur Analyse von DEHP und seiner Metabolite werden verschiedene GC-MS Systeme der Agilent 5890-Serie mit 5871-Massendetektor verwendet. Die Trennung erfolgte auf einer RT-5-Gaschromatographiesäule von Restek mit 30 m Säulenlänge, 0,25 mm Innendurchmesser und einer 0,25 µm dicken stationären Phase (90%Dimethyl-10%Diphenylpolysiloxan).

#### **4.1.1 Auswahl der internen Standards**

Für die Gruppe der Phthalate wird der in der Literatur bereits beschriebene Weichmacher Di-octylphthalat (DOP) verwendet (199). Auch für die Gruppe der Säuren (Ethylhexansäure und Phthalsäure) steht mit der trans-Zimtsäure ein interner Standard zur Verfügung, der bereits mehrfach erfolgreich bei der Bestimmung von DEHP-Metaboliten eingesetzt worden ist (200). Für den Analyten Ethylhexanol steht bisher noch kein interner Standard zur Verfügung, so dass dieser erst etabliert werden muss. Generell bieten sich für diesen Zweck längerkettige Alkohole an. Eine ausführliche Literaturrecherche in den gängigen Informationswerken der klinischen Chemie, sowie zehn Messungen von mit DEHP belasteten Patienten zeigen keine natürliche Belastung des Menschen mit Dekanol, so dass dieser Alkohol als Referenzsubstanz ausgewählt wird.

#### **4.1.2 Etablierung des Extraktionsverfahrens**

Die bereits in der Literatur mehrfach beschriebene Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Hilfe von Ultraschall hat sich für die vorliegende Aufgabenstellung als die Methode der Wahl erwiesen, da eine Fest-Flüssig-Extraktion aufgrund der sehr proteinhaltigen Probenmatrix nur sehr unzureichende Ergebnisse liefern würde. Zur Durchführung der Extraktion werden 100 µl Serum mit 100 µl Eisessig angesäuert und mit 1 ml Ethylacetat versetzt, das mit je 2 µg/ml der verschiedenen internen Standards versetzt worden ist. Diese Lösung wird für 20 Minuten bei RT im Ultraschallbad extrahiert. Danach werden die Proben 15 Minuten bei 4000 rpm

zentrifugiert und anschließend die organischen Phasen zur weiteren Verwendung abgenommen. Diese werden bis zur Trockne im Stickstoffstrom bei RT eingedampft und die Überstände in 100 µl n-Hexan aufgenommen.

#### 4.1.3 Auswahl der Derivatisierung

Einige der Metabolite können ohne eine Derivatisierung nicht gaschromatographisch getrennt werden. Die Analyten, die eine freie Säuregruppe enthalten, müssen vor der Aufbringung auf die unpolare GC-Säule derivatisiert werden, um ihre Flüchtigkeit zu erhöhen. Zu diesem Zweck bieten sich verschiedene Silylierungsreagenzien an. Ein weiteres Problem stellt das Ethylhexanol dar. Hierbei handelt es sich um einen sehr kleinen Analyten, dessen Masse durch Derivatisierung erhöht werden muss, um eine Abgrenzung vom Lösungsmittel zu erzielen. Als Derivatisierungsmittel wird daher N-Methyl-tert.-Butyldimethylsilyltrifluoroacetamid (MBDSTFA) verwendet. Die übertragene tert.-Butyldimethylsilylgruppe ist groß genug, um den Ethylhexanolpeak erfolgreich in den Phthalat-Bereich zu verschieben; andererseits können durch die Silylierung die beiden Säuren der Analytgruppe für die Gaschromatographie erschlossen werden.

Die Auswahl der besten Derivatisierungszeit und –Temperatur wurde in einer Versuchreihe ermittelt. In Tabelle 7 sind die Parameter und die entsprechende Ausbeute an silyliertem Ethylhexanol aufgetragen. Anschließend werden die Proben in GC-Vials überführt. Bis zur Messung werden sie bei 4°C gelagert.

Reaktionszeit [h]	Reaktionstemperatur [°C]	Ausbeute Ethylhexanol [%]
1	60	23
3	60	57
1	90	12
12	37	88

Tabelle 7: Reaktionsparameter der Silylierung von Ethylhexanol

#### 4.1.4 Trenn- und Detektionsverfahren

##### 4.1.4.1 Trennverfahren

Die Optimierung von Säulenmaterial und Säulenlänge ist bereits in verschiedenen Vorarbeiten vorgenommen worden (201-203), so dass in der vorliegenden Arbeit auf diese Ergebnisse zurückgegriffen werden kann. Dabei haben sich Säulen mit unpolaren Phasen (5% Diphenyl- 95% Dimethyl-Polysiloxan) bewährt; seltener werden Säulen mit schwach oder mittel polaren Phasen (14% Cyanopropylphenyl- 86% Dimethylpolysiloxan) verwendet. Säulenlängen von 25 Meter sind für eine Trennung der Phthalate und Metabolite ausreichend.

Anhand von sechs verschiedenen Temperaturprogrammen wird die Trennung weiter optimiert. Die Übersicht der verwendeten Temperaturprogramme sowie die daraus resultierenden Spektren sind hier aufgeführt.

<b>Programm</b>	<b>Starttemp. [°C]</b>	<b>Startzeit [min]</b>	<b>Rate 1 [°C/min]</b>	<b>Temperatur 2 [°C]</b>	<b>Rate 2 [°C/min]</b>	<b>Endtemperatur [°C]</b>
1	100	5	1,5	140	13,0	310
2	80	5	2,0	125	20,0	310
3	80	5	4,0	125	20,0	310
4	80	5	6,0	125	20,0	310
5	90	5	2,0	125	20,0	310
7	90	5	6,0	125	20,0	310

Tabelle 8: Verschiedene Temperaturprogramme für die gas-chromatographische Trennung

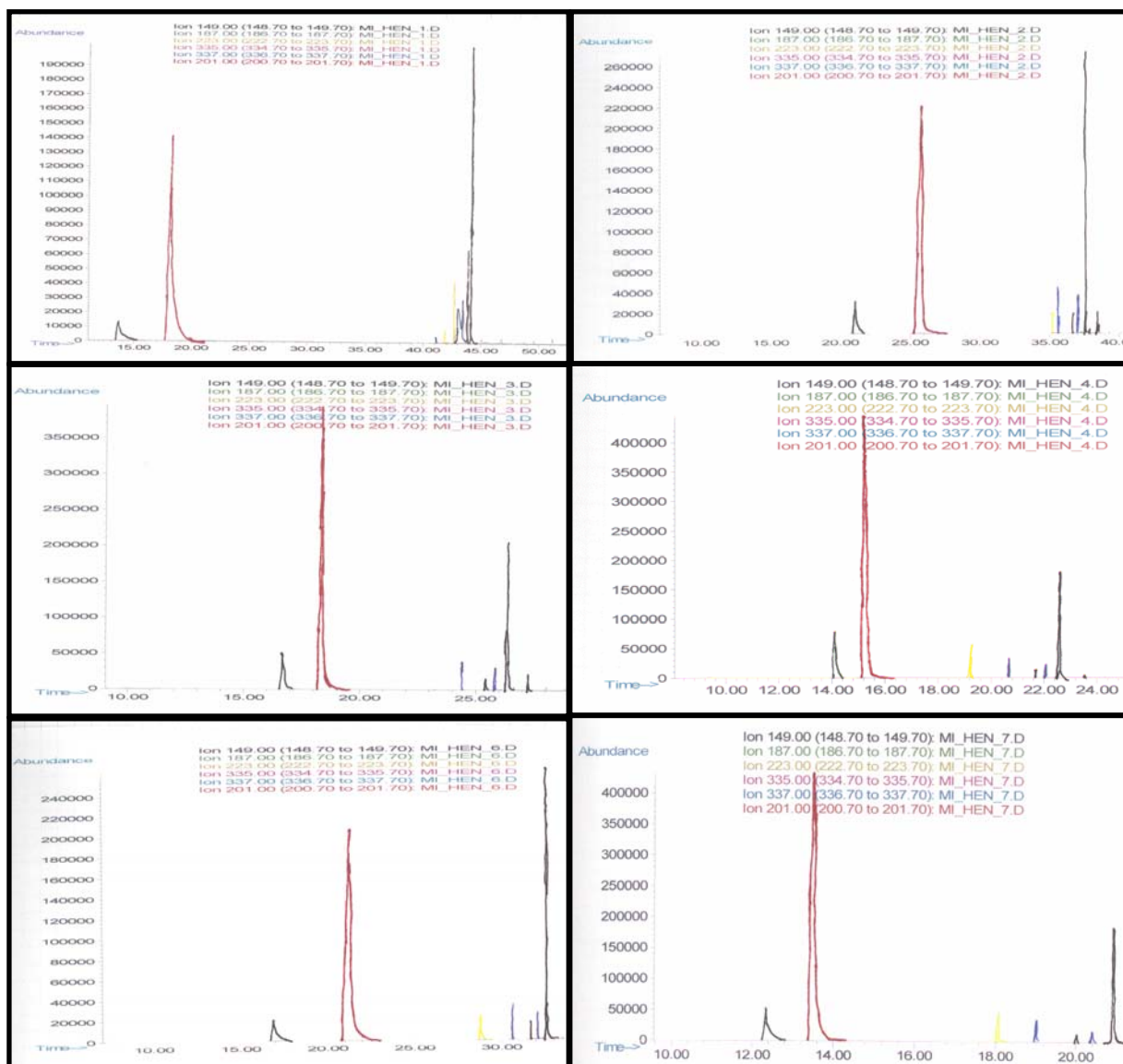


Abbildung 12: Gas-Chromatogramme der Analyten bei verschiedenen Temperaturprogrammen

Das beste Trennverhalten und das beste Peakverhältnis liefert Programm Nummer 4, so dass dieses als Standardprogramm für die Bestimmung gewählt wird.

Analyt	Retentionszeit [min]
Ethylhexanol	14,1
Ethylhexansäure	15,3
Phthalsäure	19,4
MEHP	20,2
DEHP	22,5

Tabelle 9: Retentionszeiten der Analyten aus Serum detektiert mit Rtx-5-Säule und Temperaturprogramm 4.

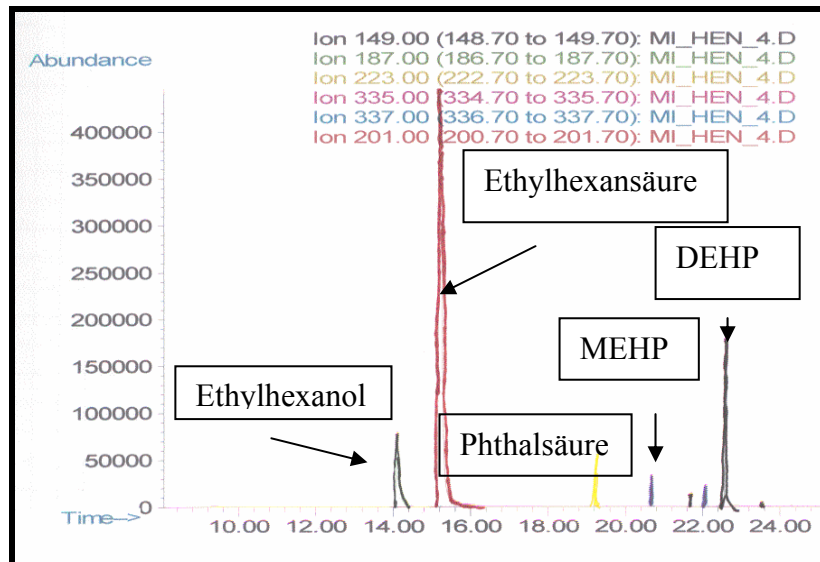


Abbildung 13: Typisches Chromatogramm der zu detektierenden Analyte aus einer Einzelmischung.

#### 4.1.4.2. Detektion

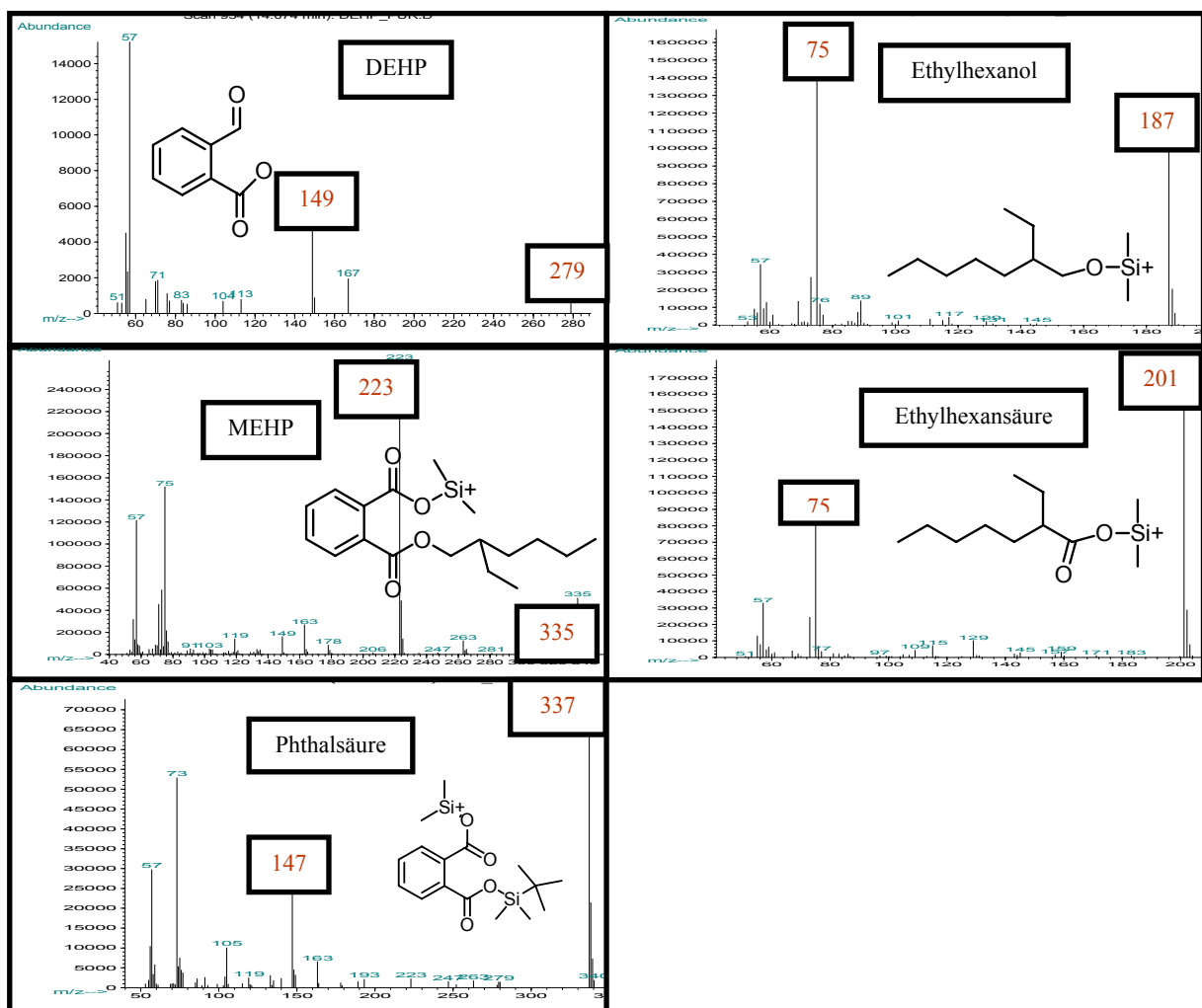


Abb. 14: Massenspektren der Analyten im Scan-Mode

<b>Analyt</b>	<b>Quantifier-Ion [m/z]</b>	<b>Identifier-Ion [m/z]</b>
DEHP	149	279
MEHP	223	335
Phthalsäure	147	337
Ethylhexanol	187	75
Ethylhexansäure	201	129

Tabelle 10: Quantifier- und Identifier-Ionen der Analyten

#### 4.1.5 Kalibration

Zur Kalibration der Konzentrationsbestimmung wird eine Standardreihe bestehend aus neun verschiedenen Konzentrationen von 0,1 bis 1,6 µg/mL je Analyt gelöst in Poolserum erstellt. Die Proben werden gemäß den oben beschriebenen Extraktions-, Derivatisierungs- und Detektionsverfahren behandelt. Die Auswertung der Proben erfolgte gemäß der DIN 38402. Die Korrelationsfaktoren und Verfahrensvariationskoeffizienten sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die ausführlichen Datentabellen für die einzelnen Substanzen sind im Anhang A einzusehen.

<b>Analyt</b>	<b>Korrelationsfaktor</b>	<b>Verfahrensvariationskoeffizient [n = 10]</b>
DEHP	$R^2 = 0,9938$	4,5%
MEHP	$R^2 = 0,9837$	12,3%
Phthalsäure	$R^2 = 0,9698$	17,8%
Ethylhexanol	$R^2 = 0,9804$	7,3%
Ethylhexansäure	$R^2 = 0,9896$	12,9%

Tabelle 11: Korrelationsfaktoren und Verfahrensvariationskoeffizienten

#### 4.1.6 Bestimmung der Leerwerte

Be keinem der bisher verwendeten Aufarbeitungsverfahren kann eine DEHP-Kontamination aus der Laborumgebung ausgeschlossen werden.



Eine kontinuierliche Messung der Leerwerte des Verfahrens erscheint daher als die bessere Alternative.

Die Mittelwerte von 15 Aufarbeitungen aus destilliertem Wasser anhand der oben aufgeführten Methode ergeben folgende Leerwerte:

<b>Analyt</b>	<b>Leerwert [<math>\mu\text{g/mL}</math>]</b>
DEHP	$0,041 \pm 0,015$
MEHP	$0,014 \pm 0,013$
Phthalsäure	$0,02 \pm 0,008$
Ethylhexanol	--
Ethylhexansäure	--

Tabelle 12: Leerwertbestimmung der Weichmachergrundbelastung im Labor aus 10 Wasserproben.

#### 4.1.7 Nachweisgrenzen

Die Bestimmung der Nachweisgrenze kann mit Hilfe von drei verschiedenen Methoden vorgenommen werden.

##### 4.1.7.1 Nachweisgrenzenberechnung anhand der analytischen Methode

Nach (204) können Nachweisgrenzen als ein bestimmtes Signal/Rausch-Verhältnis definiert werden. Ein Verhältnis von 3/1 wird in der vorliegenden Arbeit als analytische Nachweisgrenze definiert. Aus einer Probe bekannter Konzentration werden die Signal/Rausch-Verhältnisse für die einzelnen Analyte ermittelt und mittels Dreisatz werden die entsprechenden Konzentrationen für ein Verhältnis von 3/1 extrapoliert. Die erhaltenen Werte sind Tabelle 13 zu entnehmen.

<b>Analyt</b>	DEHP	MEHP	Phthalsäure	Ethylhexanol	Ethylhexansäure
<b>Nachweisgrenze [<math>\mu\text{g/mL}</math>]</b>	0,07	0,03	0,05	0,09	0,2

Tabelle 13: Nachweisgrenzen nach der Methode des Signal/Rausch-Verhältnisses

#### 4.1.7.2 Nachweisgrenzenberechnung anhand der klinischen Methode

Nach (205) werden Nachweisgrenzen definiert als Leerwertkonzentrationen plus drei Standardabweichungen. Die Bestimmung dieser Nachweisgrenzen ist daher nur für die drei Analyte geeignet, für die Angaben über Leerwerte vorliegen.

<b>Analyt</b>	DEHP	MEHP	Phthalsäure	Ethylhexanol	Ethylhexansäure
<b>Nachweisgrenze [µg/mL]</b>	0,086	0,053	0,044	--	--

Tabelle 14: Nachweisgrenzen nach der klinischen Methode

#### 4.1.7.3 Nachweisgrenzenberechnung nach DIN 32465

Während der Auswertung der Korrelationsfaktoren nach DIN 38402 mit Hilfe der verwendeten Vorlagen (siehe Anhang 1) wird gleichzeitig eine Nachweisgrenzenberechnung nach DIN 32465 durchgeführt.

<b>Analyt</b>	DEHP	MEHP	Phthalsäure	Ethylhexanol	Ethylhexansäure
<b>Nachweisgrenze [µg/mL]</b>	0,131	0,356	0,008	0,17	0,507

Tabelle 15: Nachweisgrenzen nach DIN 32465

#### 4.1.8 Wiederfindungsrate aus Serum

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate werden 10 identische Serumproben mit 1 µg/mL der Analyten gespikt und vermessen. Die Ergebnisse werden von einer Leerwertbestimmung der gleichen Probe abgezogen. Das Verhältnis von gefundener Analytmenge zu bekannter vorgelegter Analytmenge gibt die Wiederfindung im Serum an.

<b>Analyt</b>	<b>Mittelwert /%</b>	<b>RSD /%</b>
Ethylhexanol	91	7
Ethylhexansäure	95	4
Phthalsäure	90	6
MEHP	94	6
DEHP	87	4

Tabelle 16: Wiederfindungsrate aus 10 mit 1µg/mL Analyt gespikten Serumproben

## 4.2 Urinanalytik

### 4.2.1 Interne Standards, Trenn- und Detektionsmethoden

Die für die Serumanalytik etablierten internen Standards, Trenn- und Detektionsverfahren werden für die Urinanalytik übernommen. Allerdings wurde als Trennsäule für die Urinanalytik eine Rtx-1 Säule (100% Dimethylsilyl) verwendet, so dass sich die Retentionszeiten wie folgt verschieben:

Analyt	Retentionszeit [min]
Ethylhexanol	14,61
Ethylhexansäure	15,48
Phthalsäure	20,87
MEHP	21,73
DEHP	22,57

Tabelle 17: Retentionszeiten der Analyten auf Rtx-1 Chromatographiesäule mit Temperaturprogramm 4.

### 4.2.2 Extraktion und Derivatisierung

Die für die Serumanalytik entwickelte Extraktionsmethode liefert für die Urinanalytik keine Ergebnisse, da bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion sehr viel Wasser aus der Probe in das Lösungsmittel übergeht und die nachfolgende Derivatisierung stört. Auch ein zusätzlicher Trocknungsschritt mit Magnesiumsulfat liefert nur eine minimale Verbesserung der Ergebnisse. Daher werden für die Urinanalytik verschiedene Festphasen-Kartuschen evaluiert.

#### 4.2.2.1 Festphasenextraktion mit C18-Phasen

Als erste Phase werden C18-Extraktionskartuschen von International Sorbent Technology (Internationale Chemie-Technik GmbH, Bad Homburg, D) getestet. Diese unpolare Phase ist bereits von Suzuki et al. (206) für die Extraktion von Monophthalaten aus Flusswasser erfolgreich getestet worden.

Zur Extraktion der Analyten wird ein Milliliter Urin mit 100 µl Eisessig angesäuert und auf die präkonditionierten Festphasensäulen gegeben und diese im Luftstrom mittels Vac-Elute 20 System bis zur Trockne abgesaugt. Anschließend werden die Säulen

mit 2 ml Ethylacetat und 2 ml Diethylether gewaschen, das Eluat mit Hilfe von Magnesiumsulfatsäulen getrocknet und bis zur Trockne im Stickstoffstrom eingengt. Die anschließende Derivatisierung erfolgt analog 4.1.3 mit Hilfe von MBDSTFA. Eine Detektion aller Analyte ist mit dem beschriebenen Extraktionsverfahren grundsätzlich möglich, allerdings lassen sich nur die Phthalate reproduzierbar quantifizieren, wie den Korrelationsfaktoren in Tabelle 16 zu entnehmen ist.

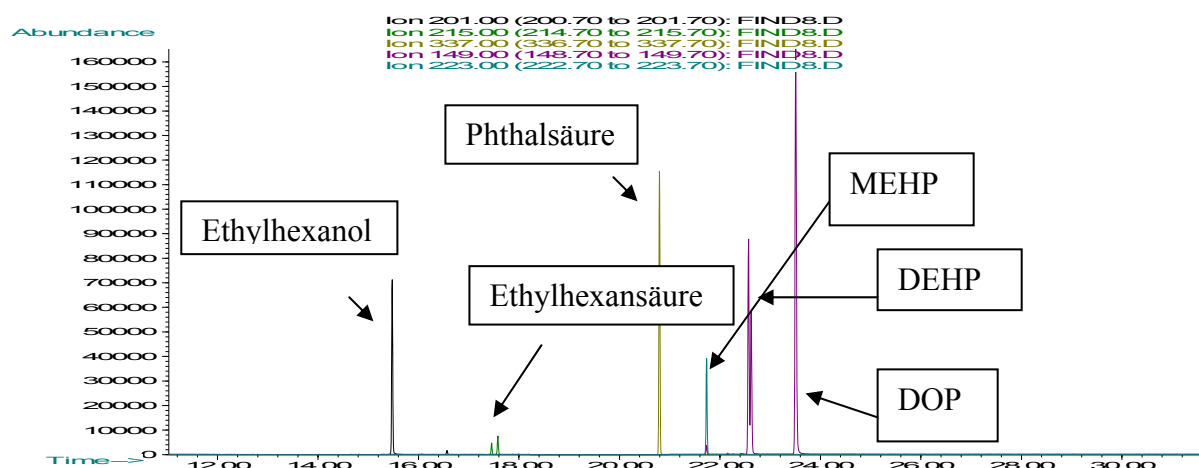


Abb. 15: Chromatogramm des Standardanalytgemisches nach Extraktion an C18-Phase und anschließender Aufarbeitung

Analyt	Korrelationsfaktoren
Ethylhexanol	$R^2 = 0,1046$
Ethylhexansäure	$R^2 = 0,0139$
Phthalsäure	$R^2 = 0,565$
MEHP	$R^2 = 0,983$
DEHP	$R^2 = 0,9769$

Tabelle 18: Korrelationsfaktoren der Analyte nach Extraktion an C18-Phase

#### 4.2.2.2 Festphasenextraktion mit Chromosorb P-Phasen

Die nächste getestete Extraktion wird mit „Chromosorb P, 80-100 mesh, acid washed“ (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) gefüllten Säulen durchgeführt. Wahl et al. gelang es 2001 erfolgreich, den DEHP-Metaboliten Ethylhexansäure, sowie zwei weitere säuregruppenhaltige Metabolite (Ethyl-oxohexansäure und Ethylhydroxyhexansäure) zu identifizieren und quantifizieren (207). Analog der Aufarbeitung 3.2.2.1 wird auch im vorliegenden Versuch die Urinprobe auf die aktivierte Kartusche aufgetragen und im Stickstoffstrom getrocknet. Anschliessend werden die Analyten mit 2 ml Ethylhexanol und 2 ml Diethylether von der

Reinigungssäule eluiert. Das Eluat wird über eine Magnesiumsulfatsäule gefiltert und danach im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird danach in 100 µl Hexan aufgenommen und mit 30 µL MBDSTFA bei 37°C über Nacht derivatisiert.

Auch diese Phase erfüllt jedoch nicht alle gestellten Ansprüche. Obwohl Wahl et al. Korrelationsfaktoren zwischen 0,9972 bis 0,9986 für die von ihnen untersuchten Analyten angeben konnten, lässt sich die beschriebene Methode nicht auf alle für diese Arbeit relevante Substanzen adaptieren.

Neben der beschriebenen Ethylhexansäure ist das untersuchte Material auch für die Extraktion von Ethylhexanol und Phthalsäure geeignet, liefert aber für die beiden Phthalate keine guten Ergebnisse.

<b>Analyt</b>	<b>Korrelationsfaktoren</b>
Ethylhexanol	$R^2 = 0,9886$
Ethylhexansäure	$R^2 = 0,9942$
Phthalsäure	$R^2 = 0,9973$
MEHP	$R^2 = 0,5548$
DEHP	$R^2 = 0,286$

Tabelle 19: Korrelationsfaktoren der Analyte nach Extraktion an Chromosorb P-Phase

#### 4.2.2.3 Festphasenextraktion mit kombinierten Phasen

Verwendet wird eine Kombination von nacheinander zu durchlaufenden Festphasen in der selben Kartusche, mit den beiden bereits getesteten Phasen Chromosorb P und C18. Dazu wird eine fertig gepackte C18-Kartusche mit Chromosorb P überschichtet. Analog der Aufarbeitung 4.2.2.1 wird auch im vorliegenden Versuch die Urinprobe auf die aktivierte Kartusche aufgetragen und im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend werden die Analyten mit 2 mL Ethylhexanol und 2 mL Diethylether von der Extraktionssäule eluiert. Das Eluat wird über eine Magnesiumsulfatsäule gefiltert und danach im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird danach in 100 µL Hexan aufgenommen und mit 30 µL MBDSTFA bei 37°C über Nacht derivatisiert.

Die Methode liefert gute Korrelationsfaktoren für alle Analyte. Die Detektion ist für alle Analyte im Bereich von 0,1 µg/mL bis 1,6 µg/mL linear.

<b>Analyt</b>	<b>Korrelationsfaktoren</b>
Ethylhexanol	$R^2 = 0,9902$
Ethylhexansäure	$R^2 = 0,9812$
Phthalsäure	$R^2 = 0,9979$
MEHP	$R^2 = 0,9973$
DEHP	$R^2 = 0,998$

Tabelle 19: Korrelationsfaktoren der Analyte nach Extraktion an kombinierten Festphasenmaterialien.

### 4.2.3 Nachweisgrenzen

Die Bestimmung der Nachweisgrenze erfolgt im vorliegenden Arbeitsabschnitt mit Hilfe des Signal/Rausch-Verhältnisses und wird anhand der Auswertung nach DIN 32465 ausgewertet.

#### 4.2.3.1 Nachweisgrenzenberechnung anhand der analytischen Methode

Nach (204) können Nachweisgrenzen als ein bestimmtes Signal/Rausch-Verhältnis definiert werden. Wie bereits gesagt wird ein Verhältnis von 3/1 in der vorliegenden Arbeit als analytische Nachweisgrenze definiert. Aus einer Probe bekannter Konzentrationen, werden die Signal/Rausch-Verhältnisse für die einzelnen Analyte ermittelt und mittels Dreisatz werden die entsprechenden Konzentrationen für ein Verhältnis von 3/1 extrapoliert. Die erhaltenen Werte sind Tabelle 20 zu entnehmen.

<b>Analyt</b>	DEHP	MEHP	Phthalsäure	Ethylhexanol	Ethylhexanäure
<b>Nachweisgrenze [µg/ml]</b>	0,049	0,097	0,048	0,1	0,03

Tabelle 20: Nachweisgrenzen nach der Methode des Signal/Rausch-Verhältnisses

#### 4.2.3.2 Nachweisgrenzenberechnung nach DIN 32465

Parallel zur Bestimmung der Korrelationsfaktoren nach DIN 38402 mit Hilfe der verwendeten Vorlagen (siehe Anhang 2) wird eine Nachweisgrenzenberechnung nach DIN 32465 durchgeführt.

<b>Analyt</b>	DEHP	MEHP	Phthalsäure	Ethylhexanol	Ethylhexansäure
<b>Nachweisgrenze [µg/ml]</b>	0,083	0,118	0,332	0,220	0,113

Tabelle 21: Nachweisgrenzen nach DIN 32465

#### 4.2.4 Wiederfindungsrate aus Urin

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate werden 10 identische Urinproben mit 1 µg/ml der Analyten gespikt und gemessen. Die Ergebnisse werden von einer ungespikten Probe abgezogen. Das Verhältnis von gefundener Analytmenge zu bekannter vorgelegter Analytmenge gibt die Wiederfindung in Urin an.

<b>Analyt</b>	<b>Mittelwert /%</b>	<b>RSD /%</b>
Ethylhexanol	93	13
Ethylhexansäure	86	5
Phthalsäure	92	3
MEHP	88	8
DEHP	95	3

Tabelle 22: Wiederfindungsrate aus 10 mit 1µg/mL Analyt gespikten Urinproben



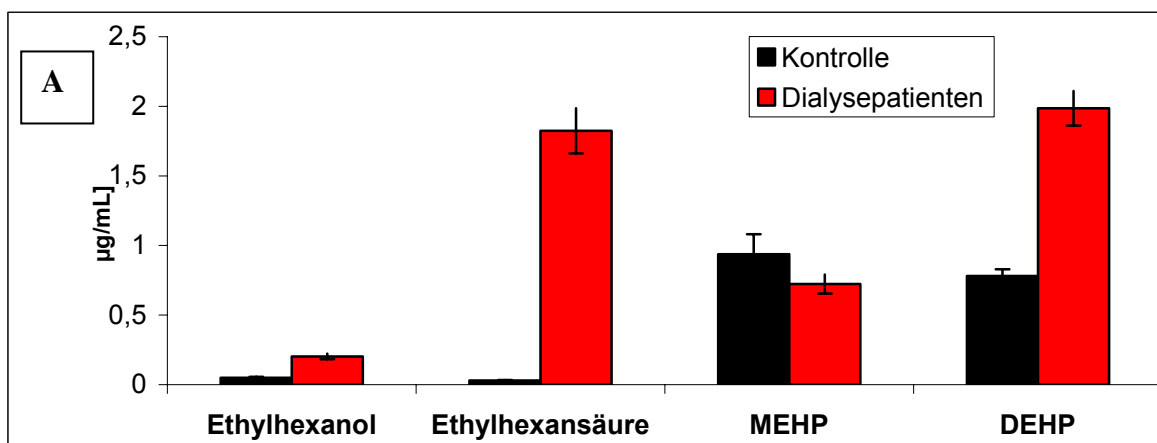
### 4.3 Klinische Studie zur Messung der Weichmacherbelastung in Hämodialysepatienten

Die Untersuchung der Serumproben chronischer Dialysepatienten zeigt eine signifikante Erhöhung der DEHP-Konzentration, sowie der meisten Metabolite. Besonders die Phthalsäure steigt auf fast die zehnfache Konzentration im Vergleich zu den nicht besonders belasteten Personen üblicherweise detektierten Werten.

Die Konzentrationen von Ethylhexanol und Ethylhexansäure steigen ebenfalls an, so dass sie in Dialysepatienten nun sicher detektiert werden können, während sich die Konzentrationen in den gesunden Kontrollpersonen sehr oft unterhalb der Nachweisgrenze befinden.

Eine Ausnahme bildet das MEHP; hier ist eine leichte Abnahme der detektierten Menge im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen.

Eine Übersicht der Konzentrationen der Analyte ist in Abbildung 16 zu sehen. Die komplette Auflistung aller Messwerte ist im Anhang C aufgeführt.



Abbildungen 16a und 16b: Serumkonzentrationen der Weichmacher und Metabolite in Dialysepatienten und gesunden Kontrollpersonen Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM

## 4.4 Molekularbiologische Untersuchungen

### 4.4.1 Methodenentwicklung für die Probenvorbereitung der PCR

Aus den stimulierten Zellsuspensionen und den entsprechenden Kontrollen konnte analog der beschriebenen Methode ausreichende RNA-Mengen für die weitere Analyse gewonnen werden. Die photometrisch bestimmten Konzentrationen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

<b>Stimulationszeit [h]</b>	<b>Konzentration unstimulierte Proben [µg/ml]</b>	<b>Konzentration DMSO-Proben [µg/ml]</b>	<b>Konzentration DEHP-Proben [µg/ml]</b>
2	53,4	49,9	36,3
3	46,9	41,5	43,4
4	68,1	48,8	33,5
6	--	--	38,5
24	100,6	143,6	57,5
48	120	164,3	118,5

Tabelle 23: Extrahierte RNA-Mengen aus den einzelnen Stimulationsansätzen

Für die Reverse Transkriptionsreaktionen werden jeweils eine Menge von 0,5 µg RNA eingesetzt.

Die folgende Tabelle zeigt das Arbeitsschema der reversen Transkription am Beispiel von drei DEHP-stimulierten Proben. Mengenangaben sind in µl angegeben.

<b>Ansätze</b>	<b>1</b>	<b>(-RT) 2</b>	<b>3</b>	<b>(-RT) 4</b>	<b>5</b>	<b>(-RT) 6</b>
Nuklease freies H <sub>2</sub> O	6,5	7,5	8	9	6,7	7,7
250 ng/μl Random Primer	1	1	1	1	1	1
DEHP 2 Stunden 0,5 μg	3,5	3,5				
DEHP 3 Stunden 0,5 μg			2	2		
DEHP 4 Stunden 0,5 μg					3,3	3,3
10 mM dNTP's	1	1	1	1	1	1
	12	13	12	13	12	13
65°C 5min inkubieren sofort auf Eis kurz anzentrifugieren						
5x First Strand Buffer	4	4	4	4	4	4
0,1 M DTT	2	2	2	2	2	2
RNaseOUT (40U/μl)	1	1	1	1	1	1
Mixen 10 min 25°C 2 min. bei 42°C inkubieren						
SSII RT (400 U) (Gibco 19427-013)	1		1		1	
	20	20	20	20	20	20
Mixen 50 min bei 42°C inkubieren 15 min 70°C inkubieren						
E. coli RNase H	1	1	1	1	1	1
20 min 37°C inkubieren Auf Eis stellen						

Tabelle 24: Protokoll der reversen Transkription am Beispiel von drei DEHP-stimulierten Proben.

## 4.4.2. Light-Cycler-PCR

### 4.4.2.1 PPAR- $\gamma$

Nach Stimulation von Jurkat-Zellen mit DEHP ist eine kontinuierliche zeitabhängige Abnahme von PPAR- $\gamma$  zu beobachten. Bereits nach 2 Stunden hat die Expression um etwa 5% nachgelassen; die Abnahme wird nach 24 Stunden signifikant, bis nach 48 Stunden nur noch etwa 40% der Kontrollgruppe exprimiert werden.

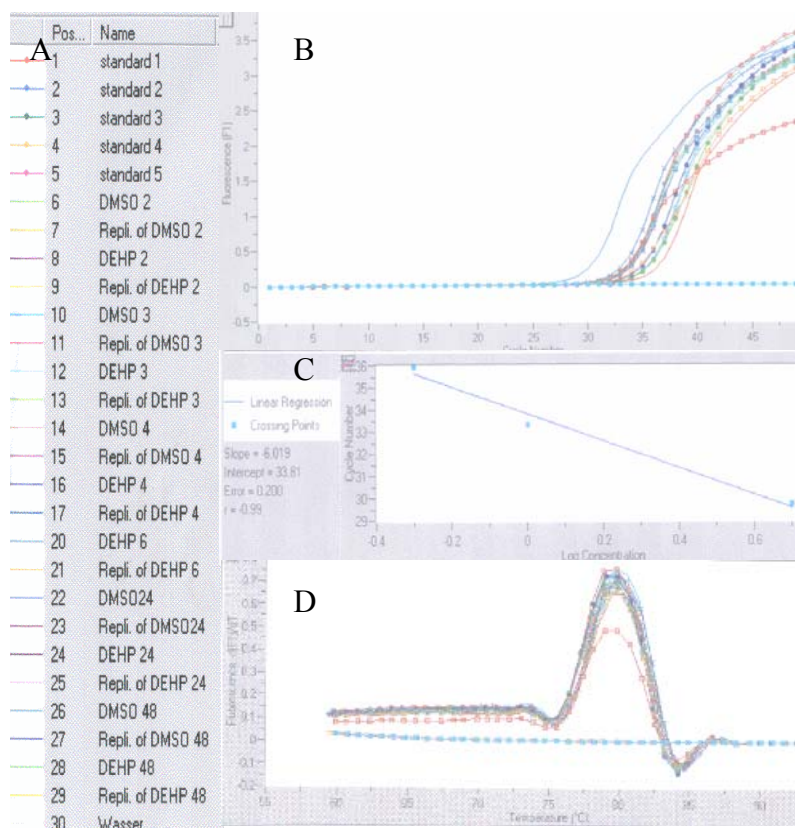


Abbildung 17:

Ergebnisse der RT-PCR von PPAR- $\gamma$  nach DEHP-Stimulation. Proben-Beschriftung (A), PCR-Lauf (B), Standardkurve (C) und Schmelzpunktbestimmung (D).

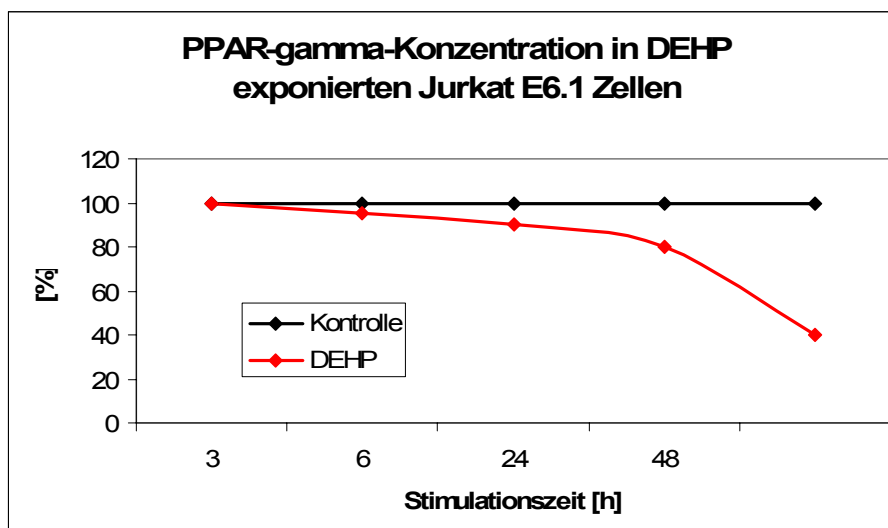


Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der Expression von PPAR- $\gamma$  in Jurkat E6.1-Zellen nach DEHP-Stimulation.

#### 4.4.2.2 PPAR- $\gamma$ 2

Nach der Gabe von DEHP (100  $\mu\text{mol/l}$ ) zeigt sich ein signifikanter Anstieg der PPAR- $\gamma$ 2 Expression auf bis zu 200% des normalen Levels nach einer Stimulationsdauer von drei Stunden. Diese Steigerung nimmt mit zunehmender Stimulationsdauer ab, bis nach 24 Stunden wieder der Normalwert erreicht ist. Nach 48 Stunden ist das Expressionsniveau sogar bis auf etwa 60% der normalen Expression gesunken.

#### 4.4.2.3 PPAR- $\alpha$

Die Stimulation mit 100  $\mu\text{mol/l}$  DEHP hat eine zeitabhängige Abnahme der PPAR- $\alpha$ -Expression in Jurkat E6.1-Zellen zur Folge. Die erste Auswertung nach einer Stimulationsdauer zeigt ein Absinken der Expression auf etwa 40% der Expressionsmenge der Kontrollzellen. Dieser initiale Effekt hält auch nach einer Stimulationsdauer von 6 Stunden an, bis die Expression nach 24 Stunden auf die normale Expression zurückkehrt. Auch nach 48 Stunden tritt keine weitere Änderung mehr ein.

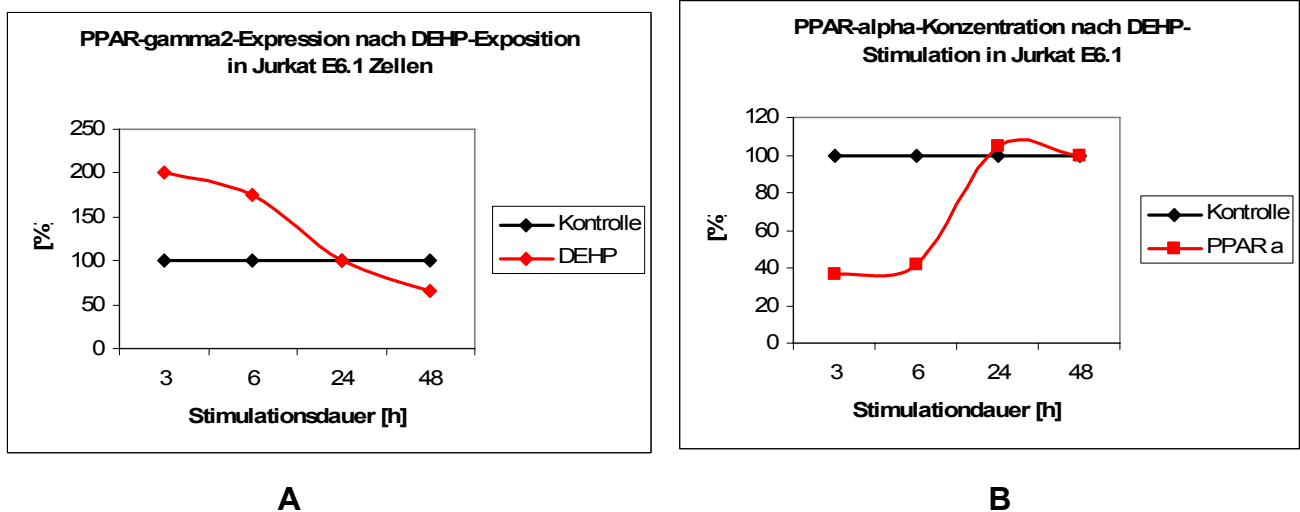


Abbildung 20 A und B  
Zeitlicher Verlauf der Expression von PPAR- $\gamma$ 2 und PPAR- $\alpha$  in Jurkat E6.1-Zellen nach DEHP-Stimulation

#### 4.4.2.4 $\Delta 6$ -desaturase

Nach der Stimulation mit DEHP ist eine signifikante Abnahme der Expression der  $\Delta 6$ -desaturase über den gesamten Stimulationszeitraum zu beobachten. Initial nimmt die detektierte Menge der  $\Delta 6$ -desaturase-Konzentration in den Jurkat-Zellen um bis zu 85% gegenüber der Kontrollgruppe ab. Im Laufe der Zeit steigt er wieder an, bis nach 48 Stunden fast wieder das Ausgangsniveau erreicht ist.

#### 4.4.2.5 hgata3

Mit Hilfe der Real-Time PCR ist es möglich, eine Expressionsmessung der hgata3-Sequenz zu etablieren. Die entwickelte Methode ist über den gesamten Messbereich von drei Zehnerpotenzen mit einem Korrelationsfaktor von 0,97 linear.

Die Stimulation von Jurkat E6.1-Zellen mit DEHP hat eine signifikante Erhöhung der hgata3 Expression nach 4 Stunden zur Folge. Die Expression steigt auf über 250% des Normalwertes an und sinkt dann nach 48 Stunden auf das Ausgangsniveau zurück.

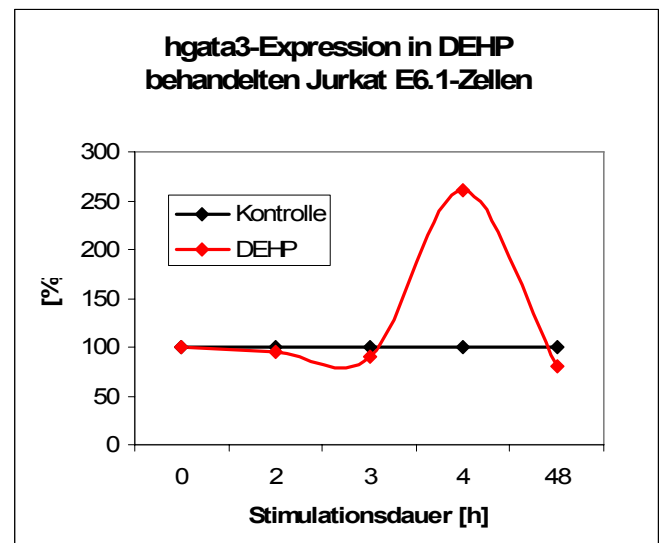
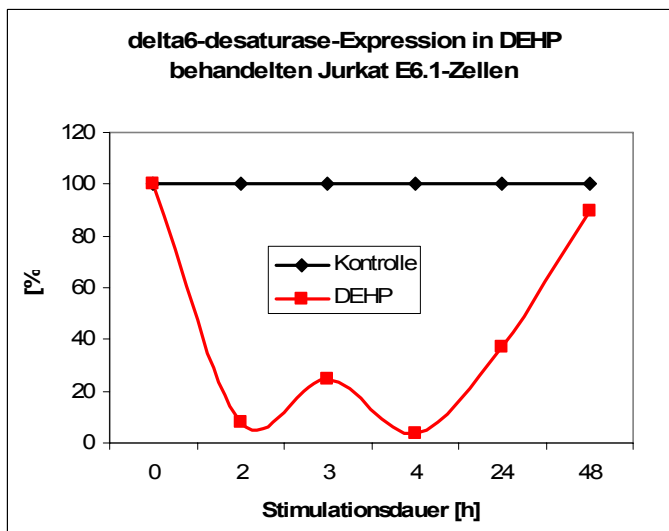


Abbildung 21 A und B

Zeitlicher Verlauf der Expression von  $\Delta 6$ -desaturase und hgata3 in Jurkat E6.1-Zellen nach DEHP-Stimulation

#### 4.4.2.6 t-bet

Auch bei der Detektion der t-bet Sequenz mit dem hier verwendeten Primer handelt es sich um eine neue Variante der Real-Time PCR. Das Verfahren zeigt ein lineares Messverhalten mit einem Korrelationsfaktor von 0,91. Die Stimulation mit DEHP hat eine signifikante, zeitabhängige Abnahme der t-bet Konzentration in Jurkat E6.1 T-Lymphocyten zur Folge. Bereits nach 2 Stunden ist die Expression auf 45% des Normalwertes gesunken und nimmt kontinuierlich ab, bis nach 48 Stunden die Expression bei etwa 5% des Kontrollwertes liegt.

#### 4.4.2.7 VCAM

Die Detektion der VCAM-Expression in Jurkat E6.1-Zellen liefert keine auswertbaren Ergebnisse. Die Methode konnte zwar erfolgreich mit dem verwendeten Primer und den beschriebenen PCR-Parametern etabliert werden, allerdings können keine sicheren Ergebnisse zur Expression von VCAM in Jurkat-Zellen gewonnen werden, da die Konzentrationen der Sequenz zu niedrig sind, um aussagefähige und reproduzierbare Ergebnisse zu gewinnen.

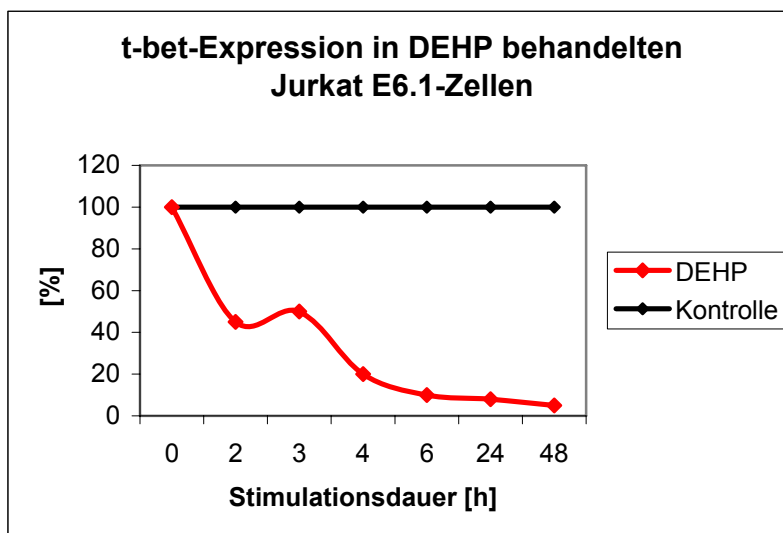


Abbildung 24  
Zeitlicher Verlauf der  
Expression von t-bet in  
Jurkat E6.1-Zellen nach  
DEHP-Stimulation

Die folgende Tabelle zeigt die jeweilige Stimulationsdauer bei der der entsprechende Transkriptionsfaktor die größte Veränderung gegenüber der Kontrollprobe erfahren hat.

<b>Transkriptionsfaktor</b>	<b>DEHP-Stimulationsdauer mit der größten Wirkung</b>
PPAR- $\gamma$	48
PPAR- $\gamma$ 2	3
PPAR- $\alpha$	3-6
$\Delta$ 6-desaturase	2-4
hgata3	4
t-bet	48

Tabelle 25: Stimulationszeiten nach denen eine Stimulation mit DEHP den größten Effekt auf den jeweiligen Transkriptionsfaktor bewirkt.



## 4.5 Tierexperimentelle Untersuchungen

### 4.5.1.1 Kurzzeitexposition mit DEHP

Bereits nach einer kurzzeitigen aerosolen Exposition der Tiere mit DEHP von jeweils 20 Minuten an fünf aufeinander folgenden Tagen ist eine Verschiebung des normalen Atemverhaltes hin zu einer methacolin-induzierten Atemwegshyperregeabilität zu verzeichnen (Abbildung 25).

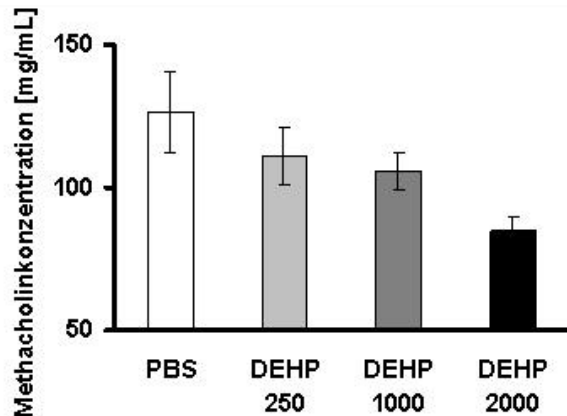


Abbildung 25:  
Methacholin-induzierte  
Atemwegsreaktion nach  
DEHP-Exposition

Diese konzentrationsabhängig und ab einer DEHP-Konzentration von 2000  $\mu\text{g/mL}$  signifikant. Die Atemwegshyperregeabilität ist mit einer signifikanten Veränderung des zellulären Lungeninfiltrats (BAL) verbunden (Abbildung 26). Das ausgewaschene Infiltrat besteht dabei ausschließlich aus Makrophagen.

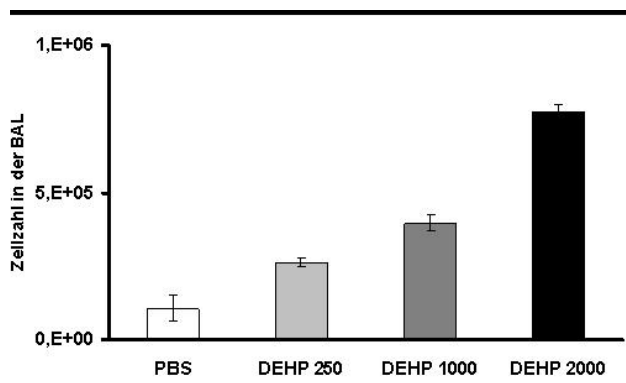


Abbildung 26:  
Konzentrationsabhängiger  
Anstieg der Zellzahl in der  
BAL nach DEHP-Exposition.

Histologisch sichtbare Veränderungen des Lungengewebes sind in den verwendeten Färbungen, Periodsäure-Schiffs-Reagenz (PAS) und Hämatoxilin-Eosin (HE) nicht zu beobachten (Abb. 27).

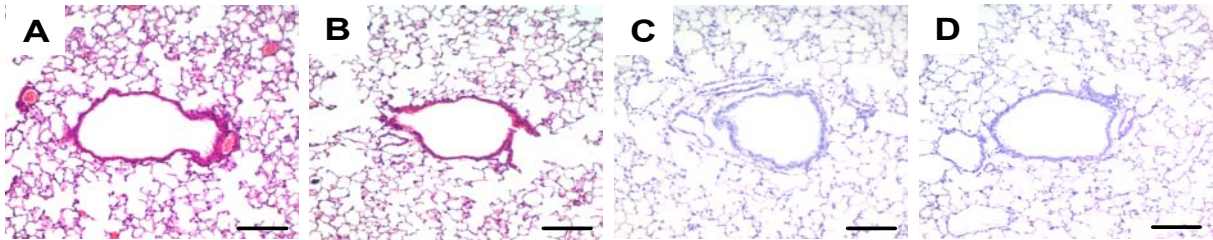


Abbildung 27: Hämatoxylin-Eosin-Färbung und PAS-Färbung an PBS (A und C) und DEHP (B und D) exponierten Tieren.

Parallel zur Steigerung der Zellzahl verläuft eine Erhöhung der NGF-Konzentration in der BAL (Abbildung 28). ist eine Verstärkung der Methacholin-induzierten Atemwegsreaktion zu beobachten.

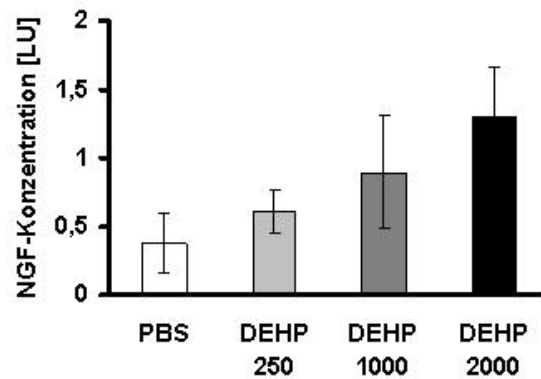


Abbildung 28: Konzentrationsabhängige Steigerung der NGF-Konzentration in der BAL nach DEHP-Exposition

Die gesteigerte NGF-Menge kann ebenfalls direkt im Gewebe mit Hilfe einer immunhistologischen Färbung nachgewiesen werden (Abbildung 29).

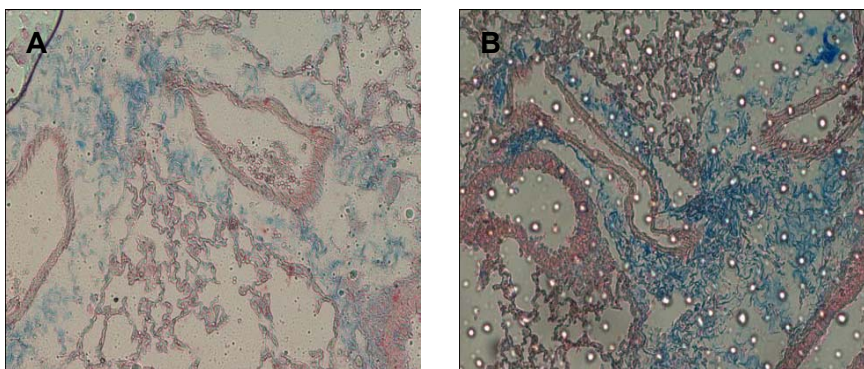


Abbildung 29: NGF-Färbung im Lungengewebe PBS (A) und DEHP (B) exponierter Tiere

#### 4.5.1.2 Modulation der DEHP- abhängigen Reaktion in NGF-transgenen Tieren

Für die nächste Versuchsreihe wurden Mäuse mit anderem genetischen Hintergrund (C57Bl6) verwendet, da für den Mausstamm BALB/c keine NGF-transgenen Stämme bekannt sind.

Bei der lokalen Aerosolbehandlung von C57Bl6 und NGF-transgenen C57Bl6-Tieren mit DEHP zeigen sich deutlich mausstammspezifische Unterschiede. So sind zwischen den beiden Expositionsgruppen (PBS und DEHP) des C57Bl6-Stammes weder in der Zusammensetzung und Zellzahl aus der BAL, der NGF-Konzentration in der BAL, noch während der Messung der Atemwegsreaktion signifikante Unterschiede feststellbar. Die beiden Tiergruppen des transgenen Stammes weisen dagegen in allen drei Punkten signifikante Veränderungen auf. Die Menge an Methacholin, die nötig ist, um eine Atemwegshyperregeabilität auszulösen, sinkt um etwa die Hälfte ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 30), gleichzeitig nimmt die Zellzahl in der BAL und die NGF-Konzentration zu (beide  $p < 0,05$ ) (Abbildung 31). Eine histologische Veränderung des Lungengewebes konnte weder in PAS, noch in HE gefärbten Lungenpräparaten nachgewiesen werden.

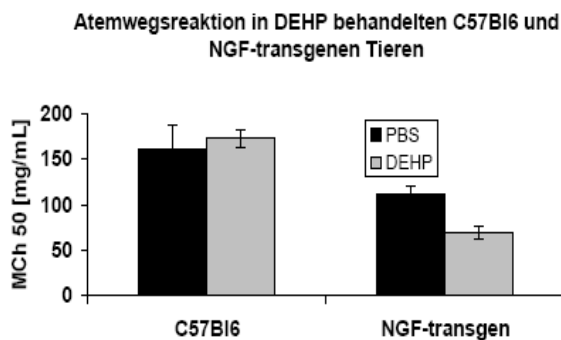


Abb. 30: Atemwegsreaktion nach DEHP-Exposition

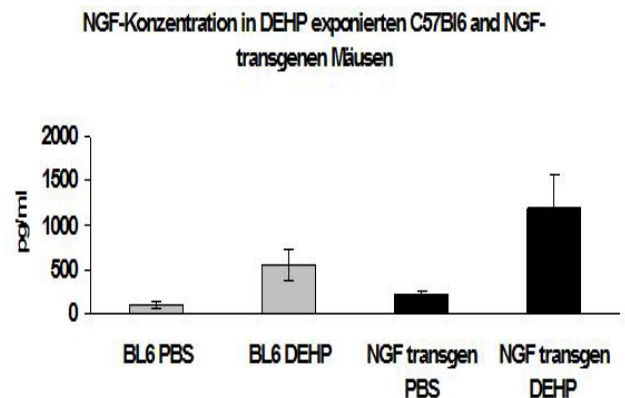


Abb. 31: NGF-Konzentration in der BAL nach DEHP-Exposition

#### 4.5.1.3 Blockieren der Atemwegsreaktion durch Gabe eines NGF-Antiserums

Im nächsten Versuch wurde gezeigt, ob durch die Behandlung mit einem polyclonalen Rabbit anti-Mouse NGF-Antiserum die, durch DEHP ausgelöste, Atemwegsreaktion wirksam verhindert werden kann. Wie die Ergebnisse der Lungenfunktionsmessung und der NGF-Konzentration zeigen (Abbildungen 32 und 33), resultiert der Einsatz des Antiserums direkt in einer Abnahme des in der BAL nachgewiesenen NGFs. Gleichzeitig wird die Methacholin-induzierte Lungenreaktion fast vollständig unterdrückt. Zwischen den DEHP-Tieren und der PBS-exponierten Negativkontrollgruppe können keine signifikanten Unterschiede bezüglich der zur Reaktion benötigten Methacholinmenge mehr nachgewiesen werden.

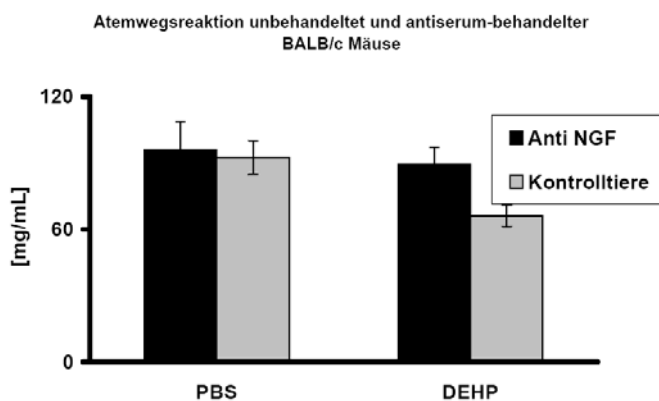
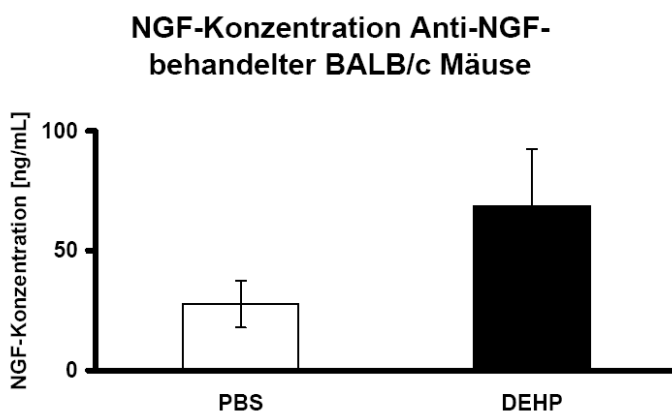
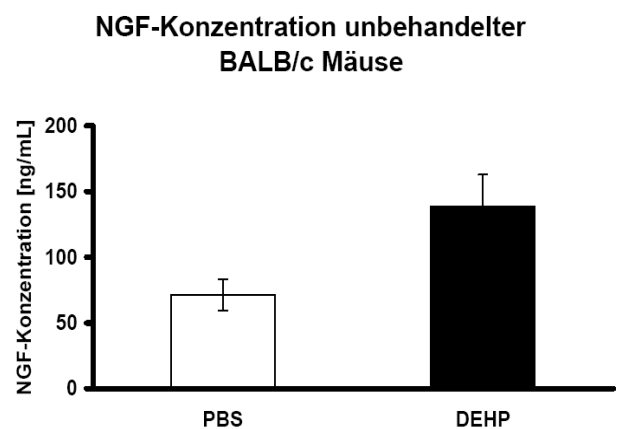


Abb. 32: Atemwegsreaktion nach DEHP-Exposition



A



B

Abb. 33a und 33b: NGF-Konzentration in der BAL nach DEHP-Exposition von unbehandelten (A) und behandelten (B) BALB/c-Mäusen.

#### 4.5.2 Verstärkung einer akuten allergischen Entzündungsreaktion in der Lunge und Immunmodulation während der Sensibilisierungsreaktion

Anders als in den vorangegangenen Versuchen, werden die Tiere nicht nur lokal mit DEHP behandelt. Der Aerosolexposition geht bei diesem Versuch eine systemische Sensibilisierung auf das Modellallergen OVA mit Aluminiumhydroxid als Adjuvants voraus. Während der Expositionsphase erfolgt die DEHP-Exposition in Verbindung mit dem Modellallergen.

Die Messung der methacholin-induzierten Atemwegsreaktion zeigt eine zusätzliche konzentrationsabhängige Verstärkung der durch die OVA-Exposition bereits induzierte Atemwegshyperregeabilität.

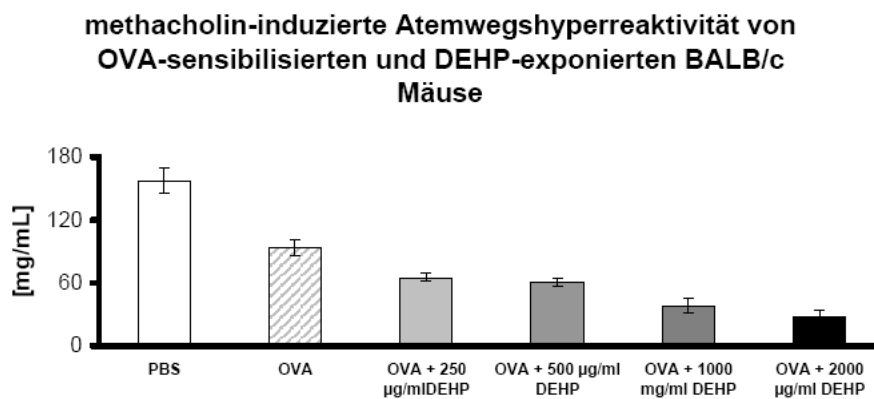
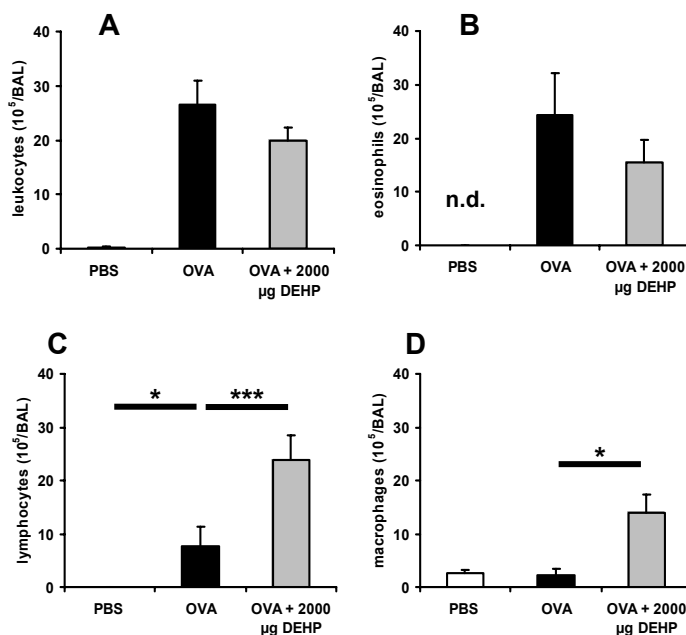


Abbildung 34:  
Atemwegshyper-  
regeabilität von  
OVA-  
sensibilisierten,  
DEHP-exponierten  
BALB/c Mäusen

Die BAL unterscheidet sich allerdings signifikant, sowohl in der Zellzusammensetzung, als auch in den Zytokinkonzentrationen. Während die BAL der Modell-

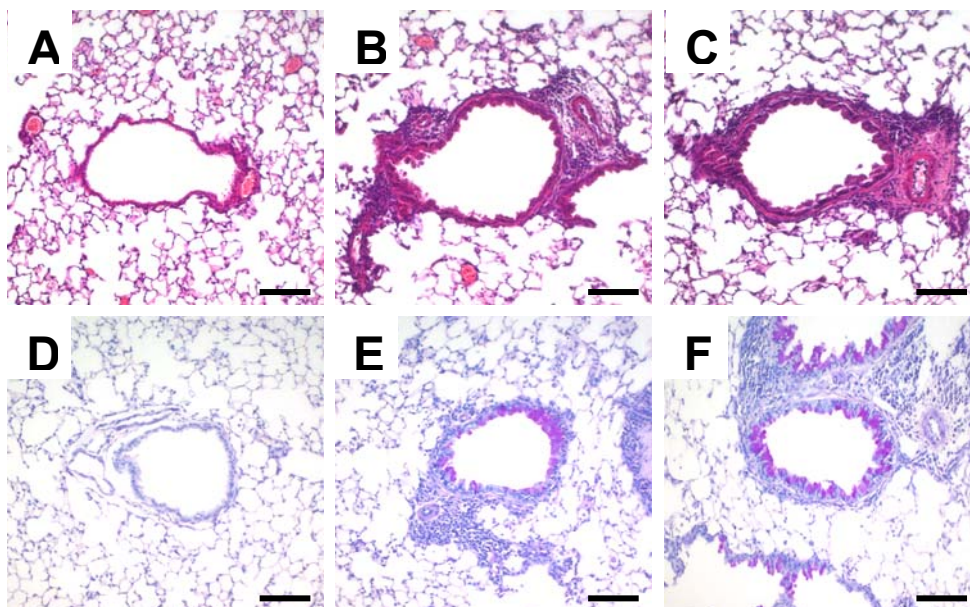


allergengruppe einen Eosinophilenanteil von über 90% aufweist, wird dieser Anteil in den DEHP-Gruppen konzentrationsabhängig signifikant reduziert. Die Anzahl der Eosinophilen bleibt dabei etwa gleich, es kommt aber eine signifikant höhere Menge an Makrophagen und Lymphozyten hinzu.

Abbildung 35: Zusammensetzung der BAL  
Gesamtzellzahl (A); Eosinophile (B); Lymphozyten (C); Makrophagen (D)

Wie die Messung der allergenspezifischen Immunglobuline IgE<sub>(OVA)</sub> und IgG1<sub>(OVA)</sub> in Verbindung mit der Beobachtung einer deutlichen Inflammation von eosinophilen Granulozyten in das Lungengewebe deutlich machen, haben alle sensibilisierten Tiere eine Erkrankung des allergisch asthmatischen Phenotypus entwickelt. Dieses Krankheitsbild konnte durch die DEHP-Provokation während der Expositionsphase deutlich verstärkt werden (Abbildung 36). In den Tieren ist eine signifikant höhere Konzentration an den Immunglobulinen IgE<sub>(OVA)</sub> und IgG1<sub>(OVA)</sub> nachzuweisen; auch die Entzündungsherde im Lungengewebe sind deutlich stärker ausgeprägt, als bei der Expositionsgruppe des reinen Modellallergen.

Auch die Zytokinlevel in der BAL werden durch die zusätzliche Provokation mit



DEHP verändert. Dosisabhängig steigen die Interleukin-10 Konzentrationen an, die Konzentrationen von IL-4 und IL-5 nehmen nach einem initialen Anstieg bei einer Konzentration von 250 µg/mL DEHP

Abbildung 36 Lungenhistologie

Lungenhistologie PBS sensibilisierte und exponierte (A, D), OVA sensibilisierte und OVA exponierte (B, E) und OVA sensibilisierte and OVA plus 2000 mg/L DEHP (C, F) exponierte BALB/c Mäuse. Representative Bilder von Hämatoxylin-Eosin (A-C) und PAS-gefärbten Lungen (D-F)

dosisabhängig ab.

Im Serum von DEHP ausgesetzten Tieren steigt der Anteil der Omega-6 Fettsäuren an der Gesamtmenge der Fettsäuren an, besonders die Arachidonsäure, welche als Ausgangssubstanz für mehrere pro-inflammatorische Leukotriene und Prostaglandine bekannt ist, findet sich signifikant erhöht. Parallel dazu nimmt die

Menge an vorhandenen Omega-3 Fettsäuren (aufgeführt am Beispiel der Eicosapentaensäure) ab.

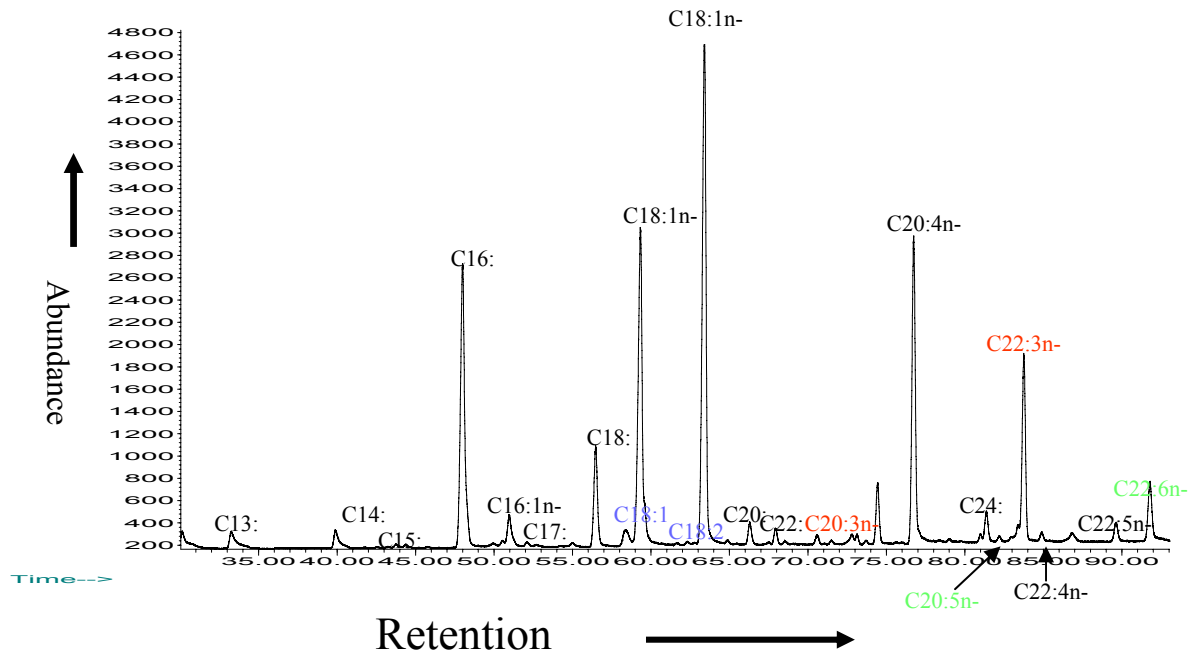


Abbildung 37: Typisches Chromatogramm der Gesamtfettsäuren in Serum

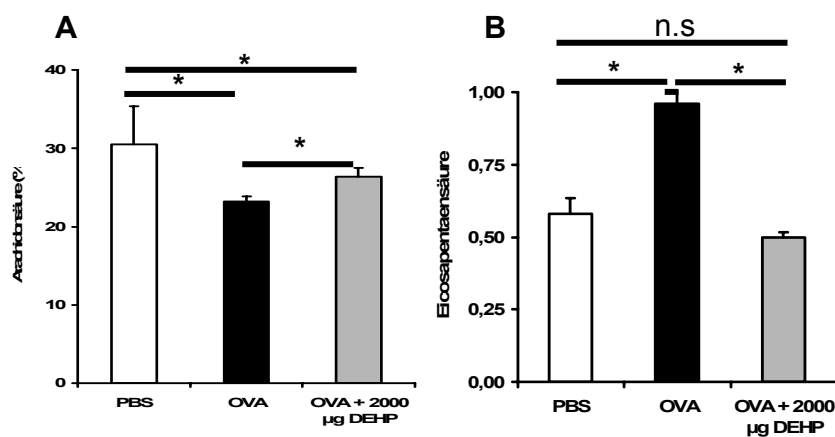


Abbildung 38:  
Anteile der Fettsäuren  
Arachidonsäure (A) und  
Eicosapentaensäure (B) an  
der Gesamtfettsäurenmenge

Ein weiterer pro-inflammatorischer Faktor, dessen Produktion durch die zusätzliche Exposition mit DEHP beeinflusst wird, ist das Leukotrien B<sub>4</sub>. Dieses ist sowohl systemisch (gemessen im Serum), als auch lokal in der Lunge (gemessen in der BAL) signifikant erhöht.

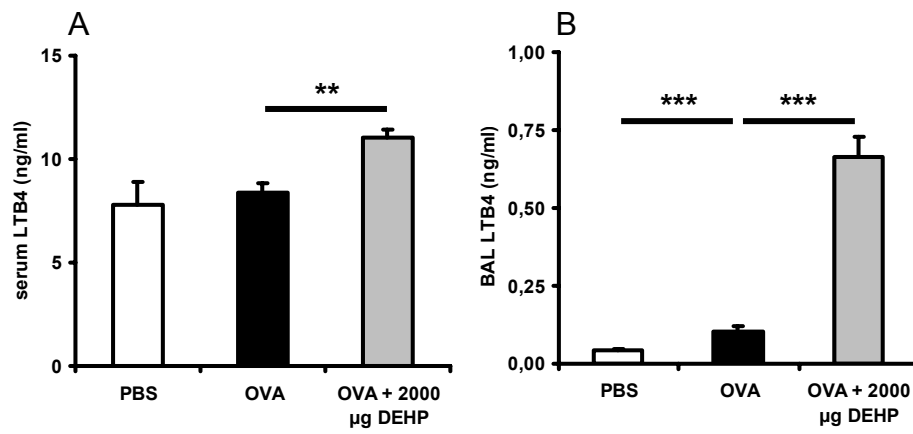


Abbildung 39:  
Leukotrien B4  
Konzentration im  
Serum (A) und in der  
BAL (B)



## 5. Diskussion

Im Rahmen der Verabschiedung der Notfallverordnung 1999/815/EG zur Untersuchung des Inverkehrbringens von bestimmten Weichmacherhaltigen Babyartikeln (Beißspielzeug) tauchte zum ersten Mal die Frage nach der Vergleichbarkeit und der Validität der einzelnen bisher beschriebenen Methoden zur Weichmacheranalytik auf. Nur mit Hilfe genau validierter Labormethoden für die Analyse von DEHP und DEHP-Metabolite kann letztendlich die gesundheitspolitische Diskussion um ein Verbot oder den Weitergebrauch von DEHP als Weichmacher auf sachlicher Ebene abseits aller Spekulationen und provozierender Aussagen entschieden werden. Ziel der vorliegenden war es in diesem Prozess zusätzliche Informationen für eine sachliche Diskussionsgrundlage zu liefern.

### 5.1. Analytik

#### Serum

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methode stellt eine Weiterentwicklung in der Weichmacheranalytik dar, für die bisher vor allem Methoden beschrieben worden sind, bei denen einzelne Analyten oder mehrerer Verbindungen der selben Stoffgruppe simultan analysiert werden. Mit Hilfe der Flüssig-Flüssig-Extraktion und anschließender Derivatisierung der Analyten, war es möglich DEHP, sowie mehrere seiner Metabolite in einem Analysenschritt gleichzeitig zu detektieren und zu identifizieren. Zum ersten Mal wird in der vorgestellten Methode die simultane Analyse von Alkoholen, organischen Säuren und Phthalaten verwirklicht. Die Methode erreicht die benötigten Nachweisgrenzen für eine sichere Bestimmung von Leerproben für alle Analyten und ist für alle Analyten im Konzentrationsbereich von 20 bis 1000 µg/L linear. Die Nachweisgrenzen wurden mit Hilfe von drei verschiedenen Methoden bestätigt.

Die Korrelationsfaktoren lagen im Bereich von 0,9698 bis 0,9938.

Die entwickelte Methode ist mit mehreren bereits beschriebenen Methoden vergleichbar (208;209), bietet jedoch zum einen eine deutliche Zeitersparnis durch die simultane Detektion mehrerer Analyten und zum anderen eine Kostenersparnis,

da keine Verbrauchsartikel für die Extraktion (Filterkartuschen, Solid-Phase-beschichtete Rührer, oder ähnliches) benötigt werden.

## **Urin**

Die Methode der Fest-Phasen-Extraktion verschiedener DEHP-Metabolite ist bereits 2001 von Wahl et al. erfolgreich etabliert worden (210). Mit Hilfe der Kombination verschiedener stationärer Phasen ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, die Methode um zwei weitere Substanzgruppen zu erweitern, so dass jetzt die fünf Analyte Ethylhexanol, Ethylhexansäure, Phthalsäure, MEHP und DEHP aus den drei Bereichen organische Säuren, Alkohole und Phthalate simultan aufgearbeitet, getrennt und detektiert und valide quantifiziert werden können. Die Korrelationsfaktoren der Methode liegen für die einzelnen Analyte zwischen 0,9812 und 0,998 mit einem linearen Bereich von 0,1 µg/mL und 1,6 µg/mL.

Die Nachweisgrenzen der einzelnen Substanzen liegen zwischen 49 und 332 ng/mL. Diese Nachweisgrenzen wurden mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt, die sich gegenseitig bestätigende Ergebnisse liefern.

Die Wiederfindung aus Urin konnte anhand von 10 Proben auf 86 bis 95% bestimmt werden, mit Standardabweichungen zwischen 3 und 13%.

## **5.2 Klinische Studie zur Weichmacherbelastung im Serum von chronischen Hämodialysepatienten**

Mit Hilfe der entwickelten analytischen Methode war es möglich, die Weichmacherbelastung in Dialysepatienten im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe zu untersuchen. Hierbei zeigten sich deutlich erhöhte Konzentrationen von DEHP und Phthalsäure.

Die Metabolite Ethylhexanol und Ethylhexansäure sind sicher aus dem Serum zu detektieren, allerdings liegen die üblichen Konzentrationen im Serum gesunder Patienten sehr nahe an der Nachweisgrenze und entsprechende Messungen liefern nur für wenige Patienten detektierbare Vergleichswerte. Für weitere Untersuchungen auf dem Gebiet der Belastungsabschätzung sollten auf jeden Fall Urin und Atemgas als zusätzliche Ausscheidungswege in eine spätere Gesamtberechnung mit einbezogen werden.

Sehr interessant ist die besonders hohe Belastung an Phthalsäure in Kombination mit leicht niedrigeren MEHP-Konzentrationen im Serum der Dialysepatienten. Sie bestätigen die Theorie von Mettang et al., die die These formulierten, dass bei Dialysepatienten die vollständige Hydrolyse von DEHP über MEHP bis zur Phthalsäure der bevorzugte Weg zu sein scheint (211;212).

### 5.3 Molekularbiologische Arbeiten

Als Vorarbeit für weitere Studien zur Konzentrationsabhängigkeit wurde eine zeitabhängige Stimulation von humanen T-Lymphozyten Jurkat E6.1 mit DEHP durchgeführt. Die Ergebnisse der zeitabhängigen Stimulation sollen dazu dienen für spätere konzentrationsabhängige Stimulationsversuche die Stimulationsdauer mit der größtmöglichen Wirkung zu bestimmen. Zunächst wurde damit begonnen, die bereits bekannte PPAR-Stimulation von DEHP in Leberzellen auf diese Zellart zu übertragen.

Dabei konnten sowohl alle Peroxisome-Proliferator-Aktivierte-Rezeptoren, als auch die  $\Delta 6$ -Desaturase in Jurkat-Zellen nachgewiesen werden, ein Ergebnis, dass so zunächst nicht zu erwarten war, da T-Lymphozyten nicht am Fettsäurestoffwechsel beteiligt sind. Bei den Untersuchungen konnten die bereits beschriebenen Ergebnisse von Wahl et al. (213) der Abnahme der  $\Delta 6$ -desaturase-Aktivität auch auf das T-Zellsystem übertragen werden. Diese korrelierte signifikant mit dem gleichzeitigen Anstieg von PPAR- $\gamma$ .

Zusammen mit der Arbeit von Wahl et al. (213) konnten übereinstimmende und sich ergänzende Ergebnisse über die Auswirkungen der DEHP-Exposition auf drei verschiedene Zelltypen nachgewiesen werden (Muskel-, Leber- und T-Zellen). Weitere Untersuchungen werden zur Zeit an Endothelzellen durchgeführt (214). Der nächste logische Schritt ist nun die Übertragung der Untersuchung an einzelnen Zellsystemen auf den gesamten Organismus. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit im Abschnitt 5.4 in-vivo Arbeiten durchgeführt.

Die Untersuchung wurde anschließend auf die Stimulation der beiden für die Th-Immunantworten verantwortlichen Transkriptionsfaktoren *hagat3* und *t-bet* ausgedehnt, da diese Faktoren gerade in T-Zellen von besonderer Bedeutung sind. *Hgata3* ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor in der Entwicklung von T2-Helferzellen und unter anderem an der Aktivierung der Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 und der Transkription der Zytokine IL-4 und 5 beteiligt. Nachdem Zhang et al. eine unterschiedliche Expression von *hgata3* in Th1 und Th2 Zellen beschrieben (215), wird angenommen, dass *hgata3* einen hohen Einfluss auf die Differenzierung und das Gleichgewicht dieser beiden T-Zell-Untergruppen besitzt. Diese Theorie wurde durch die Ergebnisse von Usui et al. untermauert, die einen negativen Effekt von *hgata3* auf die Th1-Zelldifferenzierung nachwiesen, bedingt durch die Suppression

von STAT4, einem wichtigem Transkriptionsfaktor für die Th1-Entwicklung (216). Auf der anderen Seite kann der Transkriptionsfaktor t-bet hgata3

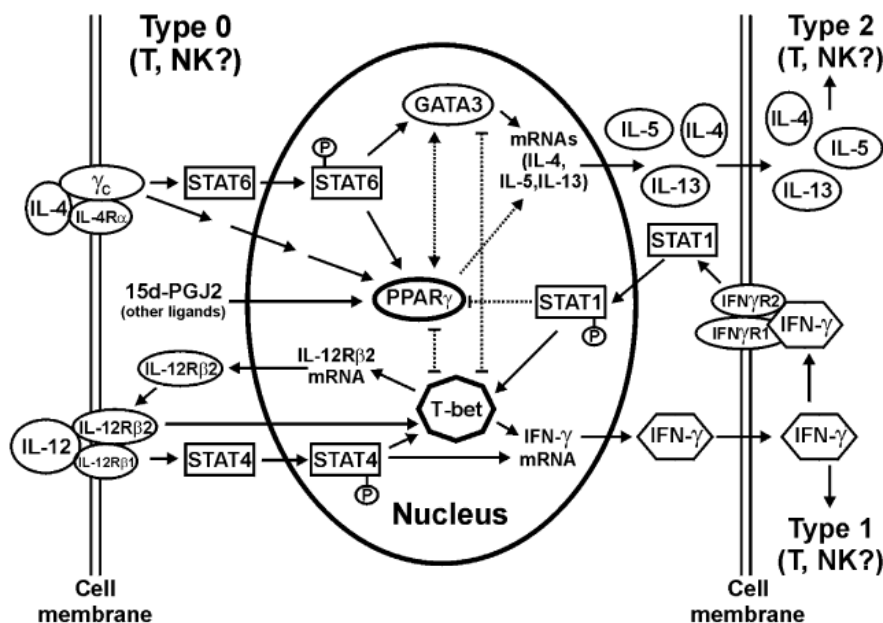


Abbildung 40 (aus (1)): Einfluß von PPAR auf die Typ1 oder Typ 2 Entwicklung der T-Helfer-Zellen über die Regulation der Transkriptionsfaktoren hgata3 und t-bet

regulieren und somit eine Th1 Entwicklung mit Interferon-γ-Transkription auslösen. Diese Wechselwirkung zwischen diesen beiden Key-Faktoren der Immunantworten konnten sehr schön anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nachvollzogen werden. Sie zeigen deutlich, dass die Stimulation mit DEHP auf T-Zellebene eindeutig eine erhöhte Expression des Transkriptionsfaktors hgata3 verursacht. Gleichzeitig ist ein Rückgang der t-bet Expression um bis zu 95% zu verzeichnen. Eine Modulation der Immunantwort durch die Stimulation mit DEHP auf T-Zellebene in Richtung Th2-Immunantwort, scheint nach den vorliegenden Ergebnissen als sehr wahrscheinlich.

Die Ergebnisse der zeitabhängigen Stimulation belegen die Notwendigkeit, den Wirkungsverlauf einer Stimulation genau zu kennen, bevor aufwendige konzentrationsabhängige Studien begonnen werden, da sonst keine aussagekräftigen Ergebnisse über die Wirkung oder Nichtwirkung erzielt werden können.

## **5.4 In vivo Arbeiten**

### **5.4.1 Exposition mit DEHP führt zu einer NGF-abhängigen Atemwegsreaktion**

Im ersten Teil der in vivo Arbeiten konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der inhalativen Exposition von DEHP und einer Reaktion der Lunge festgestellt werden, gekennzeichnet durch einen erhöhten Influx von Makrophagen in das Lungengewebe und durch eine verstärkte Reaktion auf eine durch Methacholin ausgelöste Atemwegsreaktion (Atemwegshyperregeabilität). Als mögliche Ursache konnte eine erhöhte Produktion des Neurotrophin NGF aus den eingewanderten Makrophagen identifiziert werden. Braun et al. formulierten 2001 die These, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Zahl der eingewanderten Makrophagen und der Menge an gefundenem NGF besteht (217). Bereits 1996 wurde durch Bonini et al. gezeigt, dass NGF ein wichtiger Faktor im Entstehungsprozess allergischer Erkrankungen, inklusive dem bronchialen Asthma ist (218).

Die weiteren Untersuchungen konnten in der Tat einen direkten Zusammenhang zwischen den erhöhten NGF Konzentrationen und der beobachteten Atemwegshyperregeabilität herstellen. Die Rolle der Makrophagen als NGF-Quelle und der Zusammenhang der NGF-Konzentrationen und ihr Effekt auf die Inflammation und die Atemwegshyperregeabilität wurde 1998 von Braun et al. bestätigt (219). NGF wirkt auf zwei verschiedene Arten. Es fungiert zum einen als proinflammatorisches Zytokin, das die Entwicklung der TH2-Zellen forciert, zum anderen wirkt es direkt auf die Neuronen als Mediator der Atemwegshyperregeabilität. Zudem gilt es als wichtiger Wachstums- und Differenzierungsfaktor für Mastzellen und Basophile.

In zwei Versuchsreihen konnte deutlich gezeigt werden, dass NGF-transgene Tiere, deren Clarazellen mehr NGF produzieren können, auf eine DEHP-Exposition deutlich stärker auf die Reizung der Atemwege durch Methacholin reagieren, als die entsprechend behandelten Tiere mit unverändertem genetischen C57Bl6 Hintergrund. Dabei gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen der produzierten NGF-Menge und der beobachteten Atemwegshyperregeabilität.

Ein Unterdrücken der NGF-Produktion durch die Gabe eines NGF-Antiserums, wie bereits von Päch et al. beschrieben (220), angewendet vor der DEHP-Exposition,

kann dagegen das Auftreten einer Atemwegsreaktion unterbinden. NGF ist somit als wichtiger Faktor der Lungenreaktion nach DEHP-Exposition identifiziert.

#### **5.4.2 Die Verstärkung der OVA-induzierten Atemwegsreaktion durch DEHP ist Leukotrien B4 abhängig**

Gegenüber der PBS sensibilisierten und exponierten Mäuse zeigten die mit dem Modellallergen OVA behandelten Tiere eine verschlechterte Atemwegsreaktion (Atemwegshyperregeabilität) in Verbindung mit einem massivem Influx von eosinophilen Granulozyten und einer Erhöhung der OVA-spezifischen Immunglobuline IgE und IgG1. OVA-sensibilisierte Mäuse zeigten deutliche Veränderungen von der reinen OVA-induzierten Atemwegsreaktion, wenn während der Provokationsphase eine zusätzliche DEHP-Exposition erfolgte. Von einer reinen Verstärkung der typisch asthmatischen Reaktion kann jedoch nicht die Rede sein, da die Veränderungen der ermittelten Laborwerte vom üblichen Muster des allergisch asthmatischen Phänotyps abwichen. Zwar wurden erhöhte Werte der Immunglobuline IgE und IgG1 im Serum gefunden, was auf eine Verstärkung der Th2-induzierten allergischen Immunantwort hindeutete, allerdings konnten die entsprechenden Zytokine wie Interleukin 2, 4 und 5 in der BAL nicht in erhöhtem Maße nachgewiesen werden. Auch die Zellzusammensetzung der BAL wich nach zusätzlicher DEHP-Exposition von der für die allergische Atemwegsreaktion typischen Zusammenstellung ab. Durch ein massives zusätzliches Einwandern von Makrophagen und Lymphozyten nahm der Anteil an eosinophilen Granulozyten leicht ab.

Die Verstärkung der Metacholin-induzierten Atemwegshyperregeabilität ist am ehesten auf eine verstärkte Produktion des Leukotrien B4 zurückzuführen. Dieses wird aus der Omega-6 mehrfachungesättigten Fettsäure Arachidonsäure mit Hilfe der 5-Lipoxygenase gebildet. Sowohl die Fettsäure (Serum), als auch das Leukotrien (Serum und BAL) konnten signifikant erhöht nachgewiesen werden. Der Effekt der ansteigenden Omega-6 mehrfachungesättigten Fettsäuren ist bereits für die beiden DEHP-Metaboliten Ethylhexanol und Heptanon von Wahl et al. in einem Stimulationsversuch an Leberzellen nachgewiesen worden. Die Ergebnisse der Serumanalyse lassen diesen Schluss auch für DEHP im Tierversuch zu.

Azevedo et al. berichteten 1995, dass Leukotrien B4, sowie weitere pro-inflammatorische Mediatoren in erhöhtem Maße in Alveolarmakrophagen von „keuchenden“ Kindern produziert werden (221). Es wurde bereits als wichtiger Faktor verschiedener inflammatorischer Erkrankungen, wie rheumatische Arthritis



beschrieben und wurde in letzter Zeit auch mit verschiedenen allergischen Lungenerkrankungen, inklusive Asthma in Zusammenhang gebracht. Gerade in jüngster Zeit mehren sich Untersuchungen, die einen direkten Zusammenhang zwischen der LTB<sub>4</sub>-Belastung und verschiedenen Symptomen des Asthmas, wie zum Beispiel einer bronchialen Hyperregeabilität hergestellt (222). Montuschi et al. entwickelten 2001 eine LC/MS/MS-Methode, um ausgeatmetes LTB<sub>4</sub> in asthmatischen und nicht-asthmatischen Kindern zu messen und konnten einen proportionalen Zusammenhang zwischen LTB<sub>4</sub>-Menge und dem Schweregrad der Erkrankung feststellen (223). Die Unterdrückung der Leukotrienproduktion durch verschiedene Medikamente, zum Beispiel Roflumilast (224), einem Phosphodiesterase-4 Hemmer und Thymoquinone (225) ist als wirksamer Weg die Atemwegsreaktion zu unterdrücken beschrieben worden. Montelukast (Singulär, Merck) wird bereits als Leukotrienantagonist in der Asthmatherapie eingesetzt.

Einen weiteren Hinweis, der die Theorie von Leukotrien B<sub>4</sub> als aktiven Faktor der vorliegenden Lungenreaktion untermauert, ist ein signifikant niedriger Eicosapentensäuretitel im Serum von DEHP-exponierten Tieren. Eicosapentaensäure ist Ausgangssubstanz für das Leukotrien B<sub>5</sub>, welches ein deutlich niedrigeres inflammatorisches Potential als LTB<sub>4</sub> besitzt. Ihr werden daher anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben und sie wird in der Behandlung von chronisch inflammatorischen Erkrankungen, wie rheumatische Arthritis (226) und Morbus Crohn (227) eingesetzt.

Fasst man die Ergebnisse der tierexperimentellen Untersuchungen zusammen, so lassen sich folgende Kernaussagen formulieren:

1. Die Exposition mit DEHP führt sowohl in gesunden, als auch in durch eine intraperitoneale OVA Injektion für eine allergische Reaktion prädisponierten Tieren zu einer verstärkten Atemwegsreaktion.
2. Diese Reaktion zeigt zwar Anzeichen eines allergisch asthmatischen Phänotypus, ist aber nicht ausschließlich dieser Kategorie zuzuordnen.
3. Als ausschlaggebender Faktor im Modell der unbehandelten Tiere konnte das Neurotrophin NGF identifiziert werden.
4. Als wichtiger Faktor für die Reaktion im Modell der bereits etablierten allergischen Erkrankung können die Veränderungen der Fettsäuren-

zusammensetzung und der daraus resultierenden Erhöhung der LTB<sub>4</sub>-Konzentration in Betracht gezogen werden.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten zwei schnelle und einfach durchzuführende Methoden zu Bestimmung der Weichmacherbelastung in humanen Serum- und Urinproben entwickelt werden. Diese beschränken sich nicht auf die Bestimmung des Weichmachers DEHP, sondern beziehen neben den bereits in der Literatur viel beachteten MEHP auch die Metabolite Ethylhexanol, Ethylhexansäure und Phthalsäure mit ein, die bisher als nicht aussagekräftig abgetan wurden. Da im Zuge der Weichmacherdebatte der Ruf nach validierten, vergleichbaren Methoden laut wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit besonderer Wert darauf gelegt, die Qualität der entwickelten Methoden mit Hilfe von Standardkurven, Nachweisgrenzen, Leerwertbestimmung, Präzisionsmessungen, und Wiederfindungsraten sicherzustellen.

Die Anwendbarkeit der analytischen Methode zur Bestimmung der Weichmacherkonzentrationen in Serum wurde zusätzlich anhand einer Belastungsstudie an Dialysepatienten validiert. Erfahrungsgemäß steigen die Konzentrationen an DEHP in Folge der regelmäßigen hohen Exposition durch die Dialyseschläuche erheblich an. Dieser Effekt konnte anhand der vorliegenden Methode nicht nur für DEHP, sondern auch für seine Metabolite Ethylhexanol, Ethylhexansäure und Phthalsäure nachvollziehbar dokumentiert werden. Einzig die Konzentrationen an MEHP nehmen im Vergleich zu nicht dialysierten Patienten signifikant ab, ein Effekt, der bereits von Mettang et al. (211) beschrieben wurde und allgemein auf eine verbesserte Hydrolyse des MEHP zur Phthalsäure zurückgeführt wird.

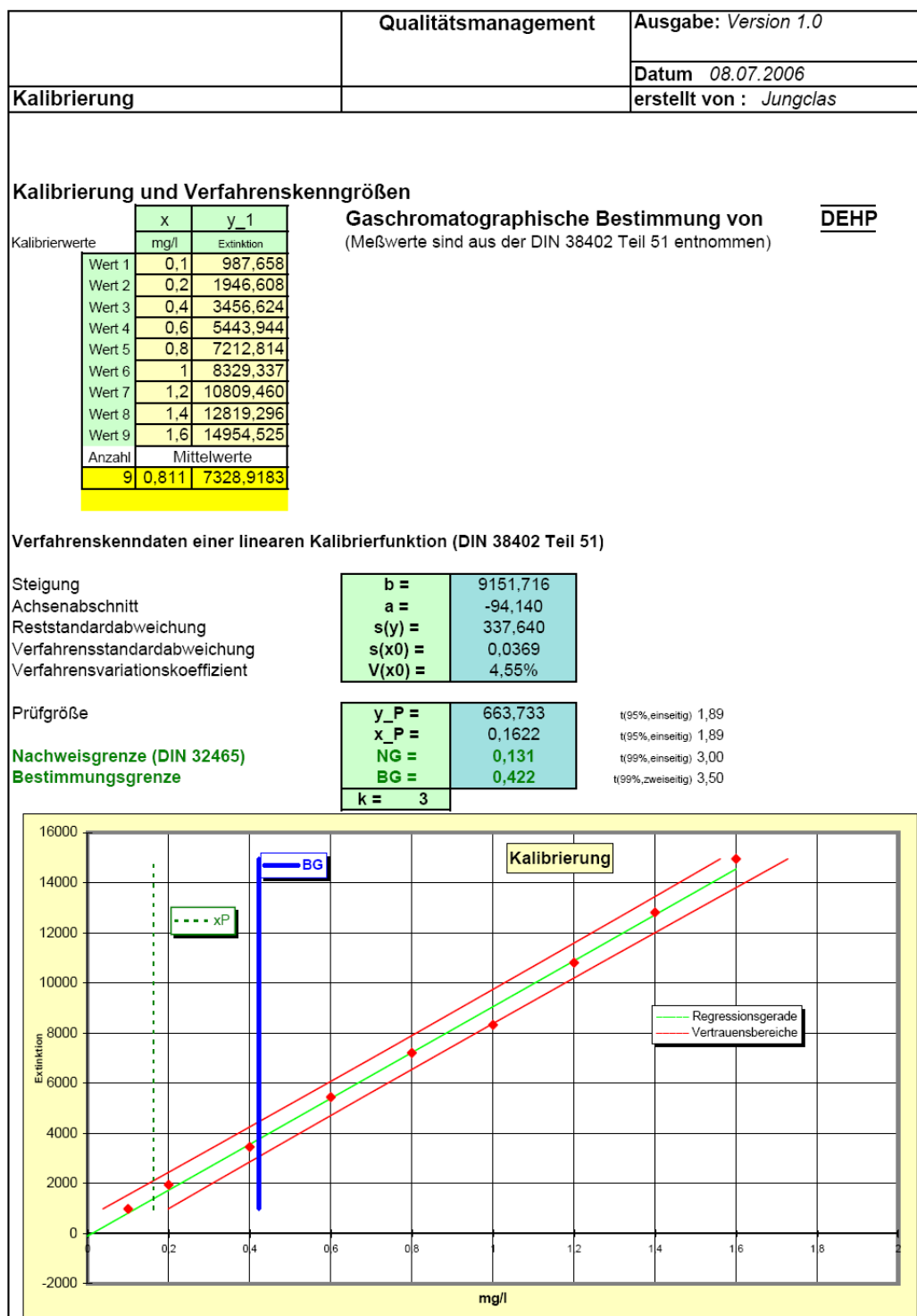
Die Untersuchungen des Effektes von DEHP auf zellulärer Ebene anhand einer zeitabhängigen Stimulation von Jurkat E6.1 T-Lymphocyten zeigten deutliche Veränderungen der Expression sowohl der Peroxisome Proliferator-aktivierten Rezeptoren  $\alpha$  und  $\gamma$ , als auch die beiden für die Immunantwort zuständigen Sequenzen *hgata3* und *t-bet*. Ein Einfluss von DEHP auf die Immunantwort des Körpers konnte somit zunächst auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse werden im Tierversuch weiter untersucht. Anhand mehrerer Versuchsmodelle wurde der Einfluss der DEHP-Exposition auf gesunde Tiere, als auch auf Tiere, die durch die Behandlung mit einem Modellallergen bereits eine allergische Lungenreaktion entwickelt hatten, untersucht. In beiden Fällen tritt eine

Verschlechterung der Atemwegsreaktion auf, jedoch kann im Falle gesunder Tiere lediglich eine erhöhte NGF- und Leukotrien B<sub>4</sub>-Produktion identifiziert werden als Ursache der Atemwegsreaktion identifiziert werden, wohingegen die Auswirkungen der Exposition bereits erkrankten Tiere (verstärkte Atemwegshyperregeabilität, erhöhte IgE-Level, erhöhte Arachidonsäure und Leukotrien B<sub>4</sub> Titer) auf eine Verstärkung der bereits vorliegenden allergischen Erkrankung hindeutet.

Die Ergebnisse dieser Versuche, zusammen mit der festgestellten extremen Weichmacherbelastung durch medizinische Verbrauchsgegenstände, wie zum Beispiel Dialyseschläuche, geben aus Sicht des Autors Gründe genug, um auf den Austausch aller DEHP-haltiger Gegenstände im medizinischen Bereich hinzuarbeiten.

## 7. Anhang

### Anhang A Korrelationsfaktoren und Nachweisgrenzen der Weichmacher nach DIN 38402 in Serum



	Qualitätsmanagement	Ausgabe: Version 1.0
		Datum 08.07.2006
Kalibrierung	Seite: 1 von 4 Seiten	erstellt von : Jungclas

### Kalibrierung und Verfahrenskenngrößen

	x	y_1
Kalibrierwerte	µg/ml	Extinktion
Wert 1	0,1	615,481
Wert 2	0,2	1487,944
Wert 3	0,4	2196,054
Wert 4	0,6	3044,324
Wert 5	0,8	3834,077
Wert 6	1	4569,164
Wert 7	1,2	5680,770
Wert 8	1,4	7193,269
Wert 9	1,6	9233,594
Anzahl	Mittelwerte	
9	0,811	4206,0752

**Chromatographische Bestimmung von**  
(Meßwerte sind aus der DIN 38402 Teil 51 entnommen)

**MEHP**

### Verfahrenskenndaten einer linearen Kalibrierfunktion (DIN 38402 Teil 51)

Steigung  
Achsenabschnitt  
Reststandardabweichung  
Verfahrensstandardabweichung  
Verfahrensvariationskoeffizient

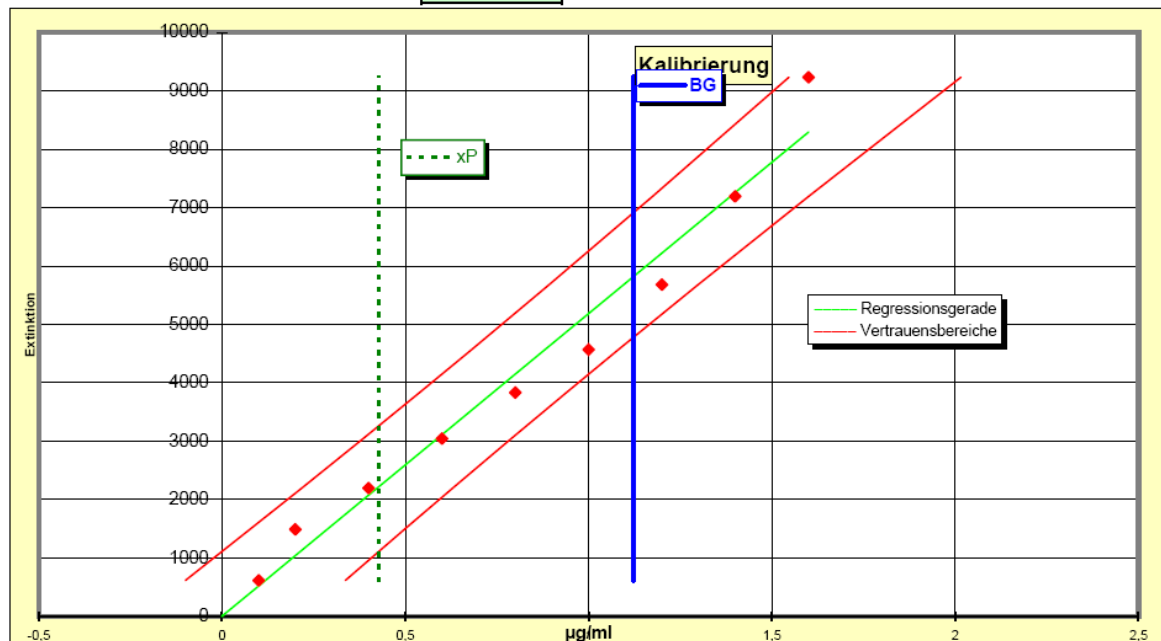
b =	5183,662
a =	1,549
s(y) =	519,096
s(x0) =	0,1001
V(x0) =	12,35%

Prüfgröße

y_P =	1166,723
x_P =	0,4266
NG =	0,356
BG =	1,123
k =	3

t(95%,einseitig) 1,89  
t(95%,einseitig) 1,89  
t(99%,einseitig) 3,00  
t(99%,zweiseitig) 3,50

**Nachweisgrenze (DIN 32465)**  
**Bestimmungsgrenze**



	Qualitätsmanagement	Ausgabe: Version 1.0
		Datum 08.07.2006
Kalibrierung	Seite: 1 von 4 Seiten	erstellt von : Jungclas

### Kalibrierung und Verfahrenskenngrößen

	x	y_1
Kalibrierwerte	mg/l	Extinktion
Wert 1	0,05	0,140
Wert 2	0,1	0,281
Wert 3	0,15	0,405
Wert 4	0,2	0,535
Wert 5	0,25	0,662
Wert 6	0,3	0,789
Wert 7	0,35	0,916
Wert 8	0,4	1,058
Anzahl	Mittelwerte	
8	0,225	0,59825

**Chromatographische Bestimmung von Phthalsäure**  
(Meßwerte sind aus der DIN 38402 Teil 51 entnommen)

### Verfahrenskennndaten einer linearen Kalibrierfunktion (DIN 38402 Teil 51)

Steigung  
Achsenabschnitt  
Reststandardabweichung  
Verfahrensstandardabweichung  
Verfahrensvariationskoeffizient

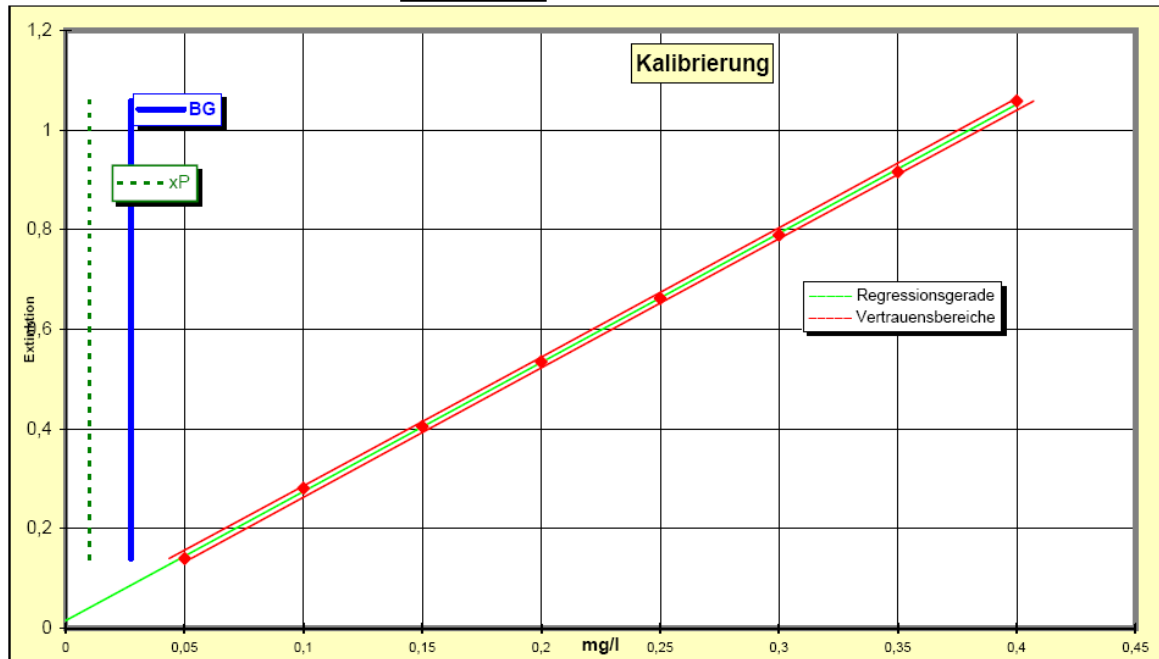
b =	2,590
a =	0,015
s(y) =	0,005
s(x0) =	0,0020
V(x0) =	0,89%

Prüfgröße

y_P =	0,028
x_P =	0,0098
NG =	0,008
BG =	0,027
k =	3

t(95%,einseitig) 1,94  
t(95%,einseitig) 1,94  
t(99%,einseitig) 3,14  
t(99%,zweiseitig) 3,71

**Nachweisgrenze (DIN 32465)**  
**Bestimmungsgrenze**



	Qualitätsmanagement	Ausgabe: Version 1.0
		Datum 08.07.2006
Kalibrierung	Seite: 1 von 4 Seiten	erstellt von : Jungclas

### Kalibrierung und Verfahrenskenngrößen

	x	y_1
Kalibrierwerte	mg/l	Extinktion
Wert 1	0,05	10572,84
Wert 2	0,01	3254,355
Wert 3	0,2	18257,62
Wert 4	0,5	54871,05
Wert 5	0,75	87579,14
Wert 6	1	107048,7
Wert 7	1,2	119558,9
Wert 8	1,4	146261,4
Anzahl	Mittelwerte	
8	0,639	68425,49

**Chromatographische Bestimmung von Ethylhexanol**  
(Meßwerte sind aus der DIN 38402 Teil 51 entnommen)

### Verfahrenskennndaten einer linearen Kalibrierfunktion (DIN 38402 Teil 51)

Steigung  
Achsenabschnitt  
Reststandardabweichung  
Verfahrensstandardabweichung  
Verfahrensvariationskoeffizient

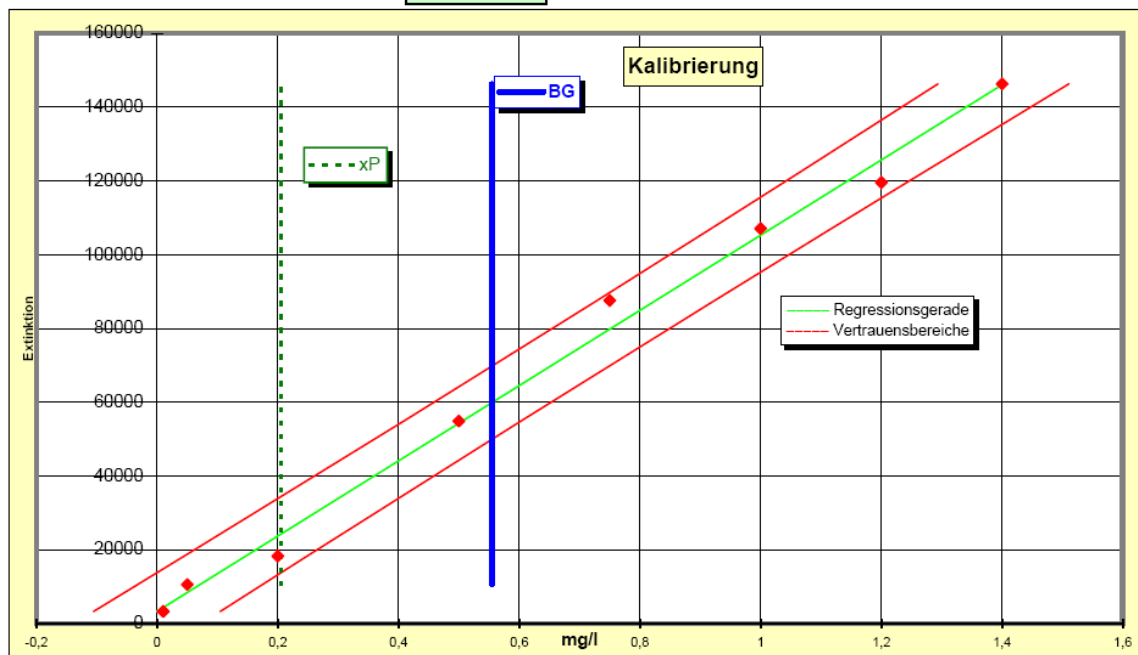
b =	101936,056
a =	3313,839
s(y) =	4780,182
s(x0) =	0,0469
V(x0) =	7,34%

Prüfgröße

**Nachweisgrenze (DIN 32465)**  
**Bestimmungsgrenze**

y_P =	14025,810
x_P =	0,2052
NG =	0,170
BG =	0,555
k =	3

t(95%,einseitig) 1,94  
t(95%,einseitig) 1,94  
t(99%,einseitig) 3,14  
t(99%,zweiseitig) 3,71





	Qualitätsmanagement	Ausgabe: Version 1.0
		Datum 08.07.2006
Kalibrierung	Seite: 1 von 4 Seiten	erstellt von : Jungclas

### Kalibrierung und Verfahrenskenngrößen

	x	y_1
Kalibrierwerte	mg/l	Extinktion
Wert 1	0,1	15048
Wert 2	0,2	27983
Wert 3	0,4	46589
Wert 4	0,6	160321
Wert 5	0,8	309976
Wert 6	1	446841
Wert 7	1,4	642156
Wert 8	1,6	959487
Anzahl	Mittelwerte	
8	0,763	326050,3

**Chromatographische Bestimmung von Ethylhexansäure**  
(Meßwerte sind aus der DIN 38402 Teil 51 entnommen)

### Verfahrenskennndaten einer linearen Kalibrierfunktion (DIN 38402 Teil 51)

Steigung  
Achsenabschnitt  
Reststandardabweichung  
Verfahrensstandardabweichung  
Verfahrensvariationskoeffizient

b =	607116,504
a =	-136876,046
s(y) =	82601,167
s(x0) =	0,1361
V(x0) =	17,84%

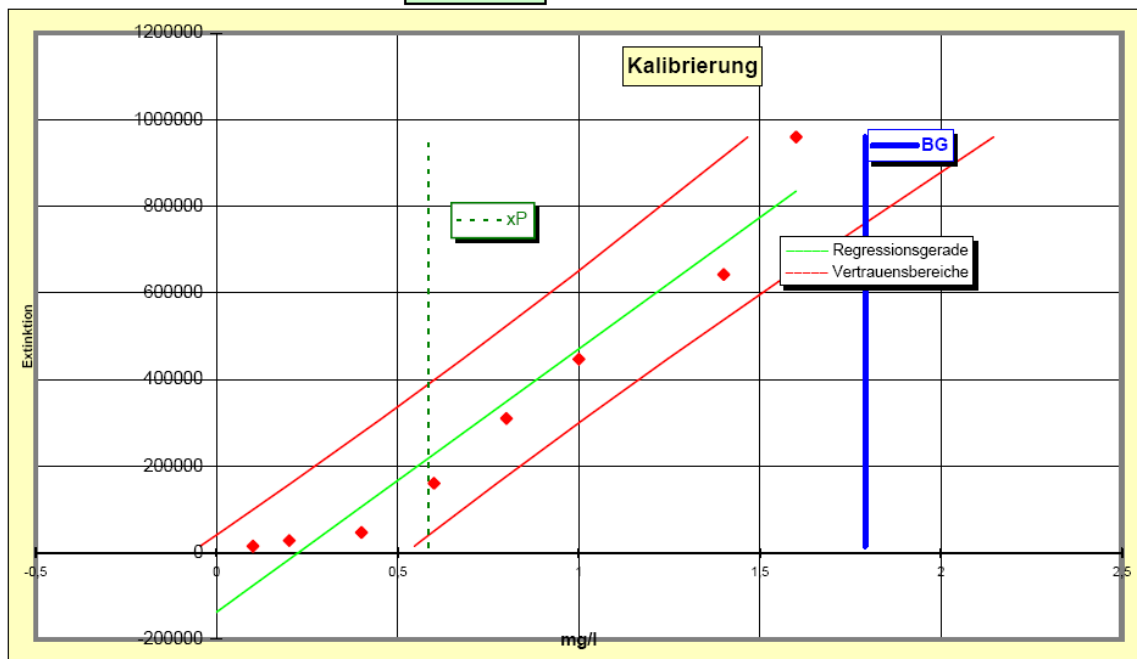
Prüfgröße

y_P =	53358,642
x_P =	0,5845
NG =	0,507
BG =	1,791
k =	3

t(95%, einseitig) 1,94  
t(95%, einseitig) 1,94  
t(99%, einseitig) 3,14  
t(99%, zweiseitig) 3,71

**Nachweisgrenze (DIN 32465)**

**Bestimmungsgrenze**



# Anhang B Korrelationsfaktoren und Nachweisgrenzen der Weichmacher nach DIN 38402 in Urin

	Qualitätsmanagement	Ausgabe: Version 1.0
		Datum 08.07.2006
Kalibrierung	Seite: 1 von 4 Seiten	

## Kalibrierung und Verfahrenskenngrößen

	x	y_1
Kalibrierwerte	mg/l	Extinktion
Wert 1	0,1	380,66
Wert 2	0,2	793,07
Wert 3	0,4	1701,63
Wert 4	0,6	2613,99
Wert 5	0,8	3438,42
Wert 6	1	4473,26
Wert 7	1,4	6560,28
Wert 8	1,6	7241,55
Anzahl	Mittelwerte	
8	0,763	3400,357

Chromatographische Bestimmung von  
(Meßwerte sind aus der DIN 38402 Teil 51 entnommen)

DEHP

## Verfahrenskenndaten einer linearen Kalibrierfunktion (DIN 38402 Teil 51)

Steigung  
Achsenabschnitt  
Reststandardabweichung  
Verfahrensstandardabweichung  
Verfahrensvariationskoeffizient

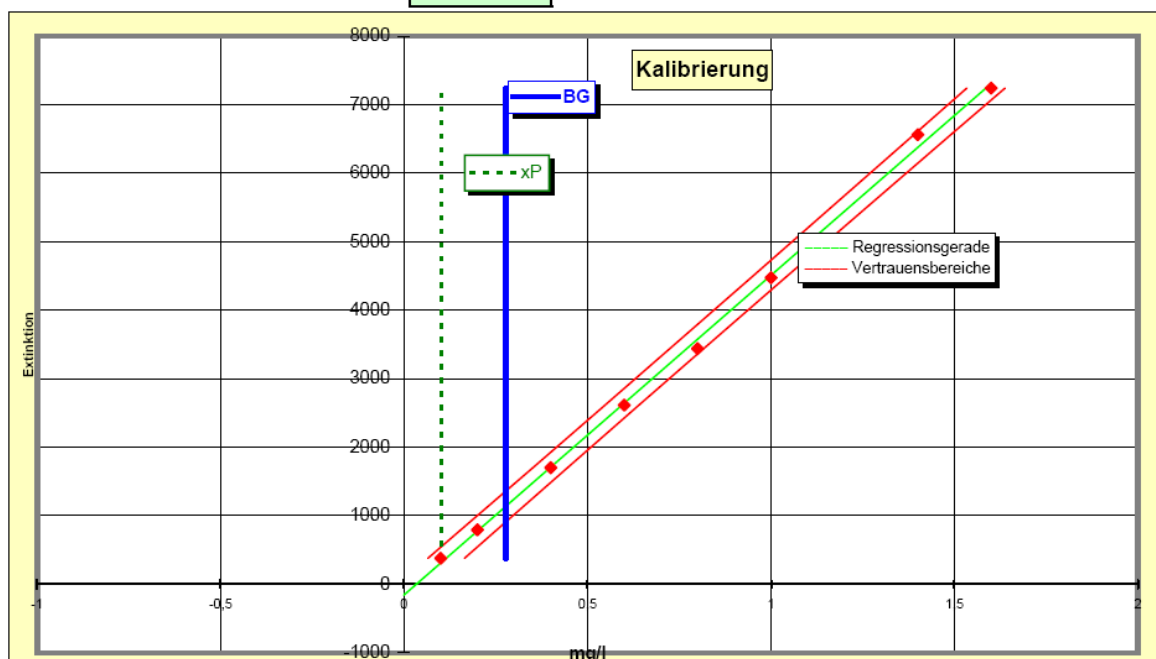
b =	4665,502
a =	-157,088
s(y) =	104,113
s(x0) =	0,0223
V(x0) =	2,93%

Prüfgröße

y_P =	82,688
x_P =	0,1014
NG =	0,083
BG =	0,278
k =	3

t(95%, einseitig) 1,94  
t(95%, einseitig) 1,94  
t(99%, einseitig) 3,14  
t(99%, zweiseitig) 3,71

Nachweisgrenze (DIN 32465)  
Bestimmungsgrenze



	Qualitätsmanagement	Ausgabe: Version 1.0
		Datum 08.07.2006
Kalibrierung	Seite: 1 von 4 Seiten	

### Kalibrierung und Verfahrenskenngrößen

Kalibrierwerte	x	y_1
	mg/l	Extinktion
Wert 1	0,1	1545,90
Wert 2	0,2	3280,51
Wert 3	0,4	6855,17
Wert 4	0,6	11021,84
Wert 5	0,8	13850,87
Wert 6	1	18226,99
Wert 7	1,4	27197,28
Wert 8	1,6	29491,37
Anzahl	Mittelwerte	
8	0,763	13933,742

**Chromatographische Bestimmung von**  
(Meßwerte sind aus der DIN 38402 Teil 51 entnommen)

**MEHP**

### Verfahrenskennndaten einer linearen Kalibrierfunktion (DIN 38402 Teil 51)

Steigung  
Achsenabschnitt  
Reststandardabweichung  
Verfahrensstandardabweichung  
Verfahrensvariationskoeffizient

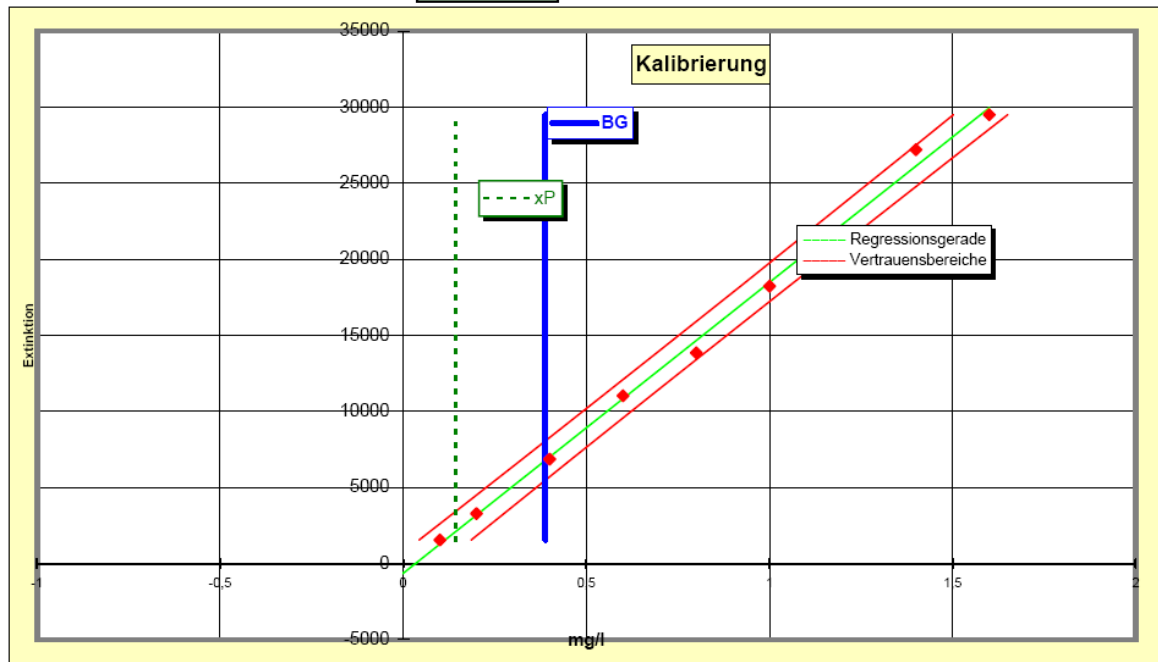
b =	19117,314
a =	-643,210
s(y) =	607,082
s(x0) =	0,0318
V(x0) =	4,16%

Prüfgröße

**Nachweisgrenze (DIN 32465)**  
**Bestimmungsgrenze**

y_P =	754,932
x_P =	0,1436
NG =	0,118
BG =	0,388
k =	3

t(95%,einseitig) 1,94  
t(95%,einseitig) 1,94  
t(99%,einseitig) 3,14  
t(99%,zweiseitig) 3,71



	<b>Qualitätsmanagement</b>	<b>Ausgabe: Version 1.0</b>
		<b>Datum</b> 08.07.2006
<b>Kalibrierung</b>		

### Kalibrierung und Verfahrenskenngrößen

	x	y_1
Kalibrierwerte	mg/l	Extinktion
Wert 1	0,1	2338281,71
Wert 2	0,2	2493529,69
Wert 3	0,4	2588115,92
Wert 4	0,6	2834090,10
Wert 5	0,8	3158801,47
Wert 6	1	3258486,45
Wert 7	1,4	3466075,13
Wert 8	1,6	3750333,36
Anzahl	Mittelwerte	
8	0,763	2985964,228

**Chromatographische Bestimmung von Phthalsäure**  
(Meßwerte sind aus der DIN 38402 Teil 51 entnommen)

### Verfahrenskenndaten einer linearen Kalibrierfunktion (DIN 38402 Teil 51)

Steigung  
Achsenabschnitt  
Reststandardabweichung  
Verfahrensstandardabweichung  
Verfahrensvariationskoeffizient

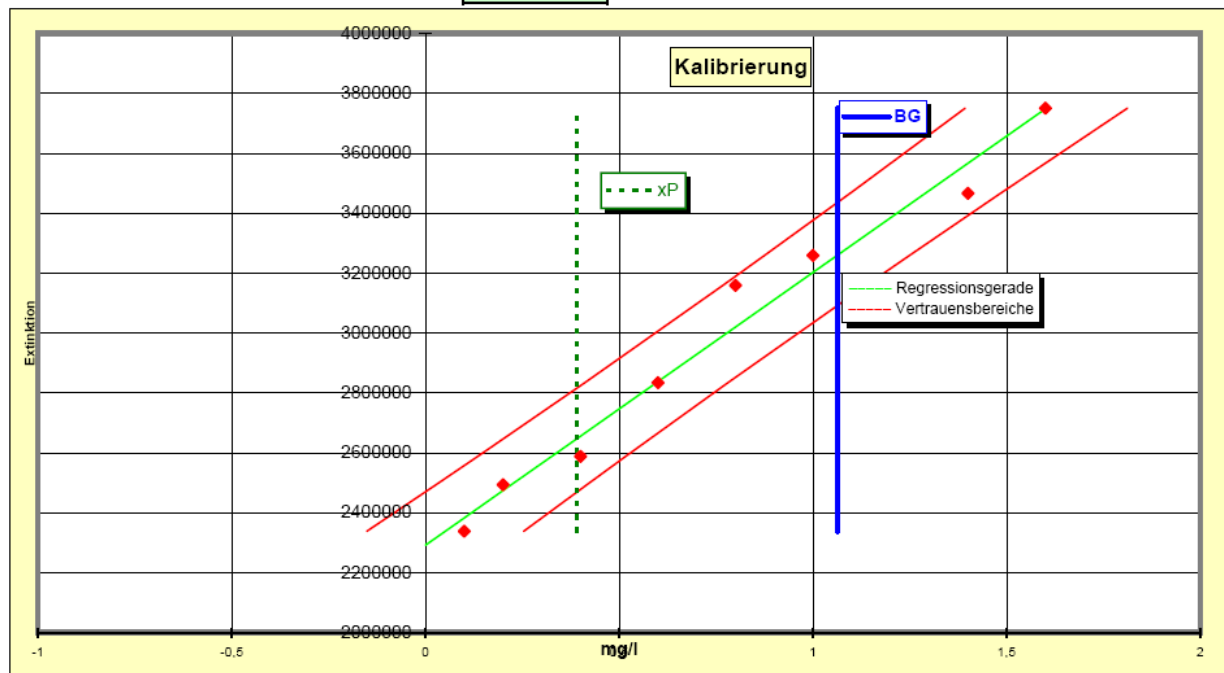
<b>b =</b>	910363,889
<b>a =</b>	2291811,762
<b>s(y) =</b>	81087,734
<b>s(x0) =</b>	0,0891
<b>V(x0) =</b>	11,68%

Prüfgröße

<b>y_P =</b>	2478560,939
<b>x_P =</b>	0,3908
<b>NG =</b>	0,332
<b>BG =</b>	1,063
<b>k =</b>	3

t(95%, einseitig) 1,94  
t(95%, einseitig) 1,94  
t(99%, einseitig) 3,14  
t(99%, zweiseitig) 3,71

**Nachweisgrenze (DIN 32465)**  
**Bestimmungsgrenze**



	Qualitätsmanagement	Ausgabe: Version 1.0
		Datum 08.07.2006
Kalibrierung		

### Kalibrierung und Verfahrenskenngrößen

	x	y_1
Kalibrierwerte	mg/l	Extinktion
Wert 1	0,1	1660,96
Wert 2	0,2	2527,74
Wert 3	0,4	4213,69
Wert 4	0,6	8318,30
Wert 5	0,8	11514,49
Wert 6	1	12941,15
Wert 7	1,4	18258,10
Wert 8	1,6	22835,04
Anzahl	Mittelwerte	
8	0,763	10283,68475

**Chromatographische Bestimmung von Ethylhexanol**  
(Meßwerte sind aus der DIN 38402 Teil 51 entnommen)

### Verfahrenskenndaten einer linearen Kalibrierfunktion (DIN 38402 Teil 51)

Steigung  
Achsenabschnitt  
Reststandardabweichung  
Verfahrensstandardabweichung  
Verfahrensvariationskoeffizient

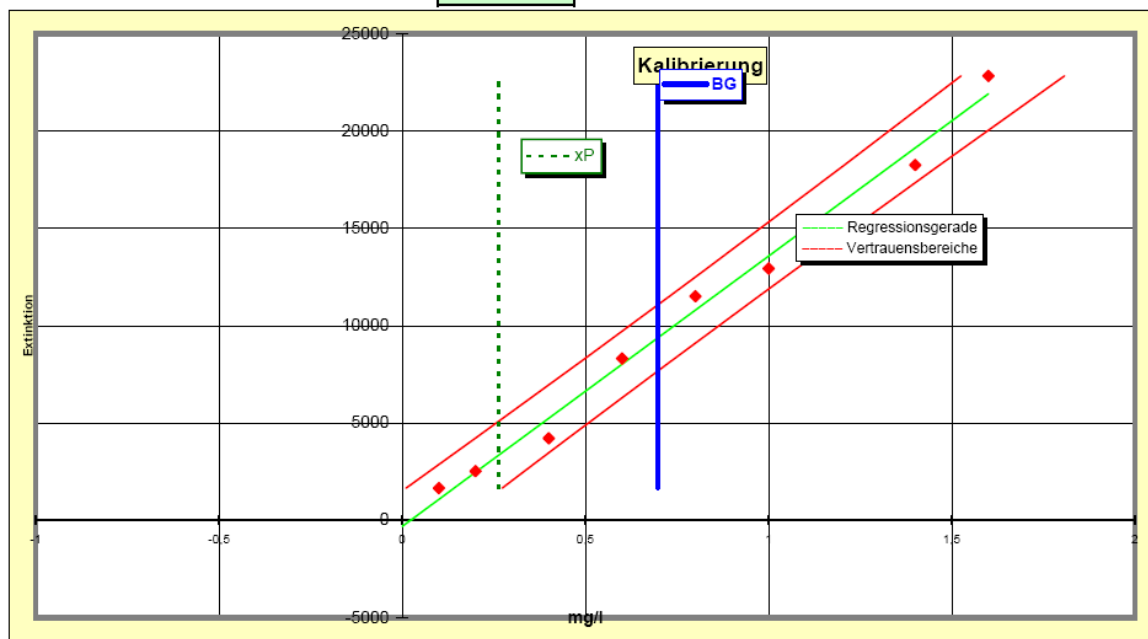
b =	13887,084
a =	-305,217
s(y) =	819,475
s(x0) =	0,0590
V(x0) =	7,74%

Prüfgröße

y_P =	1582,076
x_P =	0,2629
NG =	0,220
BG =	0,698
k =	3

t(95%,einseitig) 1,94  
t(95%,einseitig) 1,94  
t(99%,einseitig) 3,14  
t(99%,zweiseitig) 3,71

**Nachweisgrenze (DIN 32465)**  
**Bestimmungsgrenze**



	Qualitätsmanagement	Ausgabe: Version 1.0
		Datum 08.07.2006
Kalibrierung		

### Kalibrierung und Verfahrenskenngrößen

	x	y_1
Kalibrierwerte	mg/l	Extinktion
Wert 1	0,1	878999,11
Wert 2	0,2	1700404,38
Wert 3	0,4	3434764,79
Wert 4	0,6	5525130,89
Wert 5	0,8	6780997,08
Wert 6	1	9033159,88
Wert 7	1,4	12210550,05
Wert 8	1,6	13462607,65
Anzahl	Mittelwerte	
8	0,763	6628326,729

**Chromatographische Bestimmung von Ethylhexansäure**  
(Meßwerte sind aus der DIN 38402 Teil 51 entnommen)

### Verfahrenskennndaten einer linearen Kalibrierfunktion (DIN 38402 Teil 51)

Steigung  
Achsenabschnitt  
Reststandardabweichung  
Verfahrensstandardabweichung  
Verfahrensvariationskoeffizient

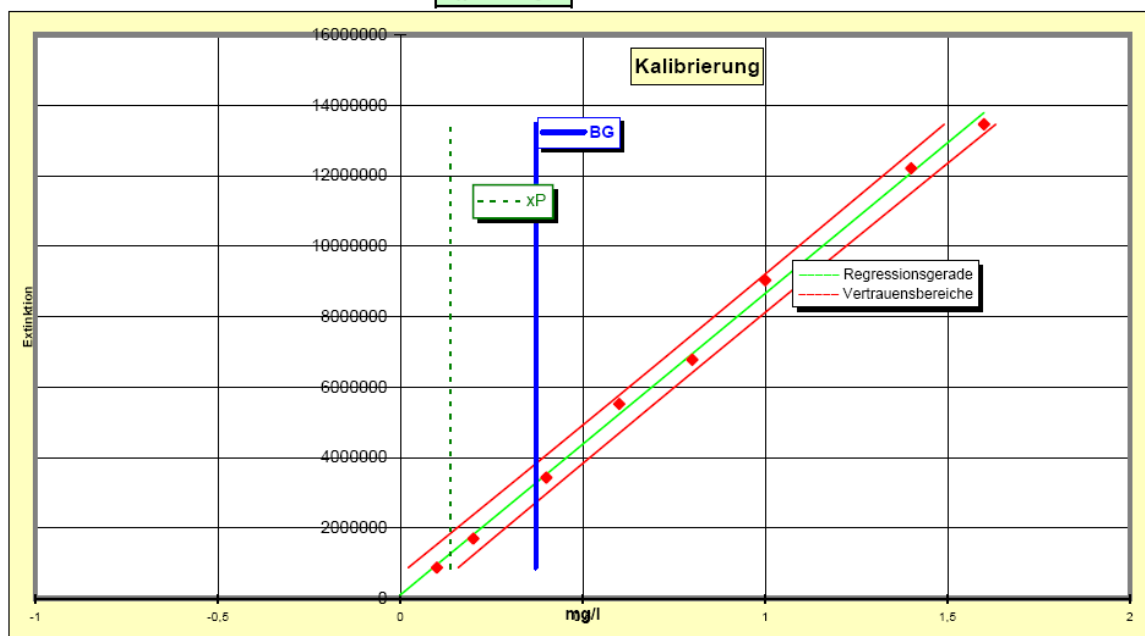
b =	8551808,560
a =	107572,702
s(y) =	259516,343
s(x0) =	0,0303
V(x0) =	3,98%

Prüfgröße

y_P =	705252,039
x_P =	0,1373
NG =	0,113
BG =	0,371
k =	3

t(95%,einseitig) 1,94  
t(95%,einseitig) 1,94  
t(99%,einseitig) 3,14  
t(99%,zweiseitig) 3,71

**Nachweisgrenze (DIN 32465)**  
**Bestimmungsgrenze**



## Anhang C Analytkonzentrationen im Serum von Dialysepatienten (1) und Gesunden Kontrollen (2)

(1)

Serumkonzentrationen [ $\mu\text{g/mL}$ ]				
Ethylhexanol	Ethylhexansäure	Phthalsäure	MEHP	DEHP
0,25	1,44	24,60	0,43	1,55
0,98	0,87	22,28	0,71	3,32
0,28	1,27	18,00	0,48	1,23
0,23	1,25	10,80	0,69	1,99
0,28	1,99	15,03	0,66	1,55
0,23	2,26	18,03	0,45	2,02
0,22	2,53	19,15	0,95	1,83
0,20	2,51	24,15	0,48	1,64
0,12	3,36	24,70	0,82	1,85
0,13	1,84	10,53	0,11	1,65
0,00	0,97	19,00	0,50	2,16
0,20	2,12	11,77	0,38	1,36
0,00	0,00	10,35	0,00	1,09
0,34	2,29	15,38	0,90	1,62
0,19	1,93	7,18	0,49	1,69
0,19	0,91	9,09	0,50	1,45
0,24	1,03	10,05	1,07	2,26
0,20	0,95	7,63	0,78	3,09
0,24	1,91	15,45	0,99	1,99
0,28	1,65	10,42	0,78	1,36
0,14	3,33	11,09	0,65	1,66
0,06	1,37	14,35	0,44	1,22
0,14	1,77	21,41	0,60	1,47
0,14	2,83	30,28	0,76	2,04
0,17	1,18	11,75	0,52	1,53
0,14	1,52	28,52	0,54	1,32
0,47	0,84	10,43	0,43	1,47
0,13	2,22	39,85	0,49	1,92
0,18	4,93	46,41	0,46	2,27
0,12	0,58	14,90	0,74	1,76
0,18	0,94	28,13	0,17	1,29
0,13	1,39	18,42	0,88	1,76
0,11	1,60	23,66	0,68	2,07
0,10	0,96	33,22	0,76	2,99
0,15	5,98	24,27	0,58	1,64
0,12	2,72	29,55	0,48	1,02
0,15	3,70	26,62	0,69	1,73
0,26	0,78	12,78	0,54	1,40
0,16	2,39	16,34	0,96	1,03
0,16	3,44	26,06	0,57	1,63
0,34	0,59	18,00	1,09	2,76
0,19	1,93	7,18	0,55	1,21
0,19	0,91	9,09	0,56	2,32
0,24	1,03	10,05	0,63	3,40
0,20	0,95	7,63	2,72	4,76
0,24	1,91	15,45	0,82	4,21
0,28	0,42	10,42	1,69	3,34
0,14	3,33	8,69	0,55	1,47
0,19	0,80	10,64	0,77	1,33
0,14	1,77	21,41	2,67	4,59
0,20	1,82	17,80	0,72	1,99
0,14	1,15	8,82	0,49	0,88
0,02	0,16	1,25	0,07	0,12

Mittelwert  
Standardabweichung  
SEM

### Analytkonzentrationen in Kontrollpersonen [ $\mu\text{g/mL}$ ]

(2)

Ethylhexanol	Ethylhexansäure	Phthalsäure	MEHP	DEHP
n.d	n.d	0,90	0,76	0,52
n.d	n.d	1,12	0,92	0,55
n.d	n.d	0,93	0,94	0,54
n.d	n.d	1,59	0,98	1,06
n.d	n.d	1,57	0,76	0,83
n.d	n.d	1,67	0,92	0,73
n.d	n.d	0,47	1,24	0,69
n.d	n.d	0,54	0,98	0,67
n.d	n.d	0,69	0,96	1,06
n.d	n.d	0,63	0,98	0,89
n.d	n.d	1,02	0,92	1,05

n.d	n.d	1,01	0,94	0,78	Mittelwert
n.d.	n.d.	0,46	0,15	0,21	Standardabweichung
n.d.	n.d.	0,14	0,05	0,07	SEM



## 8. Literaturliste

1. Zhang X, Young HA. PPAR and immune system--what do we know? Int Immunopharmacol 2002;2:1029-44.
2. European Council for Plasticisers and Intermediates. 17-2-2000.
3. European Council for Plasticisers and Intermediates. The mechanism of plasticiser action. 24-1-2000.
4. Ecobilan and La Défense cedex, France PricewaterhouseCoopers. Eco-profile of high volume commodity phthalate esters (DEHP/DINP/DIDP). 28-1-2001.
5. PVCplus Kommunikations GmbH. 11-1-2000.
6. European Council for Plasticisers and Intermediates. The mechanism of plasticiser action. 24-1-2000.
7. [www.ecpi.org/plasticisers/index.htm](http://www.ecpi.org/plasticisers/index.htm). 1-9-2001.
8. Risk & Policy Analysts Limited (Norfolk) and RiTox (Utrecht). The Availability of Substitutes for Soft PVC Containing Phthalates in Certain Toys and Childcare Articles. 2000.
9. COWI Consulting Engineers and Planners AS. Environment and Health Assessment of Alternatives to Phthalates and to flexible PVC. EPA Environmental Project No. 590  
2001. 2001.
10. TNO. TNO-report, STB-01-55, Alternatives for phthalates. 2001.
11. Wams TJ. Diethylhexylphthalate as an environmental contaminant--a review. Sci Total Environ 1987;66:1-16.

12. Kurane R. Microbial degradation of phthalate esters. *Microbiol Sci* 1986;3:92-5.
13. Kurane R. Microbial degradation and treatment of polycyclic aromatic hydrocarbons and plasticizers. *Ann N Y Acad Sci* 1997;829:118-34.
14. Baughmann, L, Paris, D. F., and Steen, W. C. Biotransformation and Fate of Chemicals in the Environment. American Society for Microbiology , 105-111. 1980.
15. Tickner JA, Schettler T, Guidotti T, McCally M, Rossi M. Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: a critical review. *Am J Ind Med* 2001;39:100-11.
16. Howard, P., Banejee, S., and Robillard, K. Measurement of water solubilities, octanol/water partition coefficients and vapor pressure of commercial phthalate esters. *Environ.Toxicol Chem.* 9, 623-636. 1985.
17. Hirayama K, Tanaka H, Kawana K, Tani T, Nakazawa H. Analysis of plasticizers in cap-sealing resins for bottled foods. *Food Addit Contam* 2001;18:357-62.
18. Doull J, Cattley R, Elcombe C, Lake BG, Swenberg J, Wilkinson C et al. A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate: application of the new U.S. EPA Risk Assessment Guidelines. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999;29:327-57.
19. Petersen JH. Survey of di-(2-ethylhexyl)phthalate plasticizer contamination of retail Danish milks. *Food Addit Contam* 1991;8:701-5.
20. Page BD, Lacroix GM. Studies into the transfer and migration of phthalate esters from aluminium foil-paper laminates to butter and margarine. *Food Addit Contam* 1992;9:197-212.
21. Page BD, Lacroix GM. The occurrence of phthalate ester and di-2-ethylhexyl adipate plasticizers in Canadian packaging and food sampled in 1985-1989: a survey. *Food Addit Contam* 1995;12:129-51.
22. Tsumura Y, Ishimitsu S, Saito I, Sakai H, Kobayashi Y, Tonogai Y. Eleven phthalate esters and di(2-ethylhexyl) adipate in one-week duplicate diet samples obtained from hospitals and their estimated daily intake. *Food Addit Contam* 2001;18:449-60.
23. Tsumura Y, Ishimitsu S, Kaihara A, Yoshii K, Nakamura Y, Tonogai Y. Di(2-ethylhexyl) phthalate contamination of retail packed lunches

- caused by PVC gloves used in the preparation of foods. *Food Addit Contam* 2001;18:569-79.
24. Tsumura Y, Ishimitsu S, Nakamura Y, Yoshii K, Kaihara A, Tonogai Y. [Contents of eleven phthalates and di(2-ethylhexyl) adipate in retail packed lunches after prohibition of DEHP-containing PVC gloves for cooking purposes]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2001;42:128-32.
  25. Tsumura Y, Ishimitsu S, Hirayama K, Fujimaki T, Nakazawa H, Tonogai Y. [Migration of di(2-ethylhexyl) phthalate from polyvinyl chloride tubes used in preparation of foods]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2002;43:254-9.
  26. Tsumura Y, Kaihara A, Ishimitsu S, Yoshii K, Tonogai Y. [Contents of plasticizers in cap-sealing for bottled food and their migration into food]. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 2002;43:377-84.
  27. Tsumura Y, Ishimitsu S, Saito I, Sakai H, Tsuchida Y, Tonogai Y. Estimated daily intake of plasticizers in 1-week duplicate diet samples following regulation of DEHP-containing PVC gloves in Japan. *Food Addit Contam* 2003;20:317-24.
  28. Hirayama K, Tanaka H, Kawana K, Tani T, Nakazawa H. Analysis of plasticizers in cap-sealing resins for bottled foods. *Food Addit Contam* 2001;18:357-62.
  29. Castle L, Gilbert J, Eklund T. Migration of plasticizer from poly(vinyl chloride) milk tubing. *Food Addit Contam* 1990;7:591-6.
  30. Wieslander G, Norback D, Nordstrom K, Walinder R, Venge P. Nasal and ocular symptoms, tear film stability and biomarkers in nasal lavage, in relation to building-dampness and building design in hospitals. *Int Arch Occup Environ Health* 1999;72:451-61.
  31. Uhde E, Bednarek M, Fuhrmann F, Salthammer T. Phthalic esters in the indoor environment--test chamber studies on PVC-coated wallcoverings. *Indoor Air* 2001;11:150-5.
  32. Oie L, Hersoug LG, Madsen JO. Residential exposure to plasticizers and its possible role in the pathogenesis of asthma. *Environ Health Perspect* 1997;105:972-8.
  33. Liss GM, Albro PW, Hartle RW, Stringer WT. Urine phthalate determinations as an index of occupational exposure to phthalic anhydride and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Scand J Work Environ Health* 1985;11:381-7.

34. Wilkinson CF, Lamb JC. The potential health effects of phthalate esters in children's toys: a review and risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol* 1999;30:140-55.
35. European Commission. Commission Decision of 7 December 1999 adopting measures prohibiting the placing on the market of toys and childcare articles intended to be placed in the mouth by children under three years of age made of soft PVC containing one or more of the substances di-iso-nonyl phthalate (DINP), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), dibutyl phthalate (DBP), di-iso-decyl phthalate (DIDP), di-n-octyl phthalate (DNOP), and butylbenzylphthalate (BBP). *Official Journal of the European Communities* 1999/815/EC, L 315, 46-49. 9-12-1999.
36. Directive 76/769/EEC 22nd amendment. 2005.
37. Sjoberg P, Bondesson U, Kjellen L, Lindquist NG, Montin G, Ploen L. Kinetics of di-(2-ethylhexyl) phthalate in immature and mature rats and effect on testis. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1985;56:30-7.
38. Sjoberg P, Lindqvist NG, Ploen L. Age-dependent response of the rat testes to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect* 1986;65:237-42.
39. Sjoberg P, Bondesson U, Gustafsson J. Metabolism of mono-(2-ethylhexyl)phthalate in fetal, neonatal and adult rat liver. *Biol Neonate* 1988;53:32-8.
40. Pollack GM, Li RC, Ermer JC, Shen DD. Effects of route of administration and repetitive dosing on the disposition kinetics of di(2-ethylhexyl) phthalate and its mono-de-esterified metabolite in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;79:246-56.
41. Ng KM, Chu I, Bronaugh RL, Franklin CA, Somers DA. Percutaneous absorption and metabolism of pyrene, benzo[a]pyrene, and di(2-ethylhexyl) phthalate: comparison of in vitro and in vivo results in the hairless guinea pig. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;115:216-23.
42. Melnick RL, Morrissey RE, Tomaszewski KE. Studies by the National Toxicology Program on di(2-ethylhexyl)phthalate. *Toxicol Ind Health* 1987;3:99-118.
43. Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL, Jordan S, Matthews HB. Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species

differences in metabolism of DEHP. *Environ Health Perspect* 1982;45:19-25.

44. Park EJ, Park SY, Joe EH, Jou I. 15d-PGJ2 and rosiglitazone suppress Janus kinase-STAT inflammatory signaling through induction of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and SOCS3 in glia. *J Biol Chem* 2003;278:14747-52.
45. Calkin AC, Thomas MC, Cooper ME. MK-767. Kyorin/Banyu/Merck. *Curr Opin Investig Drugs* 2003;4:444-8.
46. Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, Cobb JE, Collins JL, Consler TG et al. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry* 2002;41:6640-50.
47. Yang TT, Xiong Q, Enslen H, Davis RJ, Chow CW. Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 2002;22:3892-904.
48. Cullingford TE, Dolphin CT, Sato H. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha-selective activator ciprofibrate upregulates expression of genes encoding fatty acid oxidation and ketogenesis enzymes in rat brain. *Neuropharmacology* 2002;42:724-30.
49. Niho N, Takahashi M, Kitamura T, Shoji Y, Itoh M, Noda T et al. Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in Apc-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Cancer Res* 2003;63:6090-5.
50. Wang YL, Frauwirth KA, Rangwala SM, Lazar MA, Thompson CB. Thiazolidinedione activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma can enhance mitochondrial potential and promote cell survival. *J Biol Chem* 2002;277:31781-8.
51. Etgen GJ, Oldham BA, Johnson WT, Broderick CL, Montrose CR, Brozinick JT et al. A tailored therapy for the metabolic syndrome: the dual peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/gamma agonist LY465608 ameliorates insulin resistance and diabetic hyperglycemia while improving cardiovascular risk factors in preclinical models. *Diabetes* 2002;51:1083-7.
52. Schmid P, Schlatter C. Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in man. *Xenobiotica* 1985;15:251-6.
53. US-ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U. S. Department of Health and Human Services Public Health Service.

Toxicological Profile for di(2-ethylhexyl)Phthalate.  
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp9.pdf> . 2006.

54. Loff S, Kabs F, Witt K, Sartoris J, Mandl B, Niessen KH, Waag KL. Polyvinylchloride infusion lines expose infants to large amounts of toxic plasticizers. *J Pediatr Surg* 2000;35:1775-81.
55. Peck CC, Odom DG, Friedman HI, Albro PW, Hass JR, Brady JT, Jess DA. Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) accumulation in whole blood and red cell concentrates. *Transfusion* 1979;19:137-46.
56. Peck CC, Odom DG, Albro PW, Jess DA, Barrett BB. Effect of heat on the conversion of di-2-ethylhexyl phthalate to mono-2-ethylhexyl phthalate in human plasma. *Transfusion* 1981;21:163-6.
57. Sjoberg P, Gustafsson J. [Exposure to plasticizers in medical care]. *Nord Med* 1986;101:270-1.
58. Wams TJ. Diethylhexylphthalate as an environmental contaminant--a review. *Sci Total Environ* 1987;66:1-16.
59. US-FDA. Safety assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) released from PVC medical devices. <http://www.fda.gov/cdrh/ost/dehp-pvc.pdf> . 2001.
60. Dirven HA, van den Broek PH, Jongeneelen FJ. Effect of di(2-ethylhexyl)phthalate on enzyme activity levels in liver and serum of rats. *Toxicology* 1990;65:199-207.
61. Liss GM, Albro PW, Hartle RW, Stringer WT. Urine phthalate determinations as an index of occupational exposure to phthalic anhydride and di(2-ethylhexyl)phthalate. *Scand J Work Environ Health* 1985;11:381-7.
62. Albro PW, Lavenhar SR. Metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate. *Drug Metab Rev* 1989;21:13-34.
63. Schmid P, Schlatter C. Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in man. *Xenobiotica* 1985;15:251-6.
64. Rhodes C, Orton TC, Pratt IS, Batten PL, Bratt H, Jackson SJ, Elcombe CR. Comparative pharmacokinetics and subacute toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in rats and marmosets: extrapolation of effects in rodents to man. *Environ Health Perspect* 1986;65:299-307.

65. Fay M, Donohue JM, De Rosa C. ATSDR evaluation of health effects of chemicals. VI. Di(2-ethylhexyl)phthalate. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. *Toxicol Ind Health* 1999;15:651-746.
66. Koch HM, Bolt HM, Angerer J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* 2004;78:123-30.
67. Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Angerer J. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* 2005;79:367-76.
68. Melnick RL, Morrissey RE, Tomaszewski KE. Studies by the National Toxicology Program on di(2-ethylhexyl)phthalate. *Toxicol Ind Health* 1987;3:99-118.
69. Huber WW, Grasl-Kraupp B, Schulte-Hermann R. Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk. *Crit Rev Toxicol* 1996;26:365-481.
70. Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA, Shay N. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nutr* 2003;133:1238-43.
71. Krauskopf, L. G. Studies of the toxicity of phthalate via ingestion. *Environ. Health Perspect.* 3, 61-72. 1973.
72. Petersen, R. Toxicology of plastic devices having contact with blood. Contract NIH-NHLI-73-2098-B. 1975. Washington D.C. National Technical Information Service.
73. Cave W TJ. Differential Effects of Specific Types of Dietary Lipid on Mammary Tumor Development. In: Abraham S, ed. *arcinogenesis and Dietary Fat*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1989:85-99.
74. Clark LW. The decarboxylation reaction. In: Patai, ed. *he chemistry of Carboxylic Acids and Esters*. London: Interscience, 1969:589-622.
75. Oishi S. Reversibility of testicular atrophy induced by Di(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Environ Res* 1985;36:160-9.
76. Oishi S. Testicular atrophy induced by di(2-ethylhexyl)phthalate: changes in histology, cell specific enzyme activities and zinc concentrations in rat testis. *Arch Toxicol* 1986;59:290-5.

77. Oishi S. Effects of co-administration of di(2-ethylhexyl)phthalate and testosterone on several parameters in the testis and pharmacokinetics of its mono-de-esterified metabolite. *Arch Toxicol* 1989;63:289-95.
78. Sjoberg P, Bondesson U, Kjellen L, Lindquist NG, Montin G, Ploen L. Kinetics of di-(2-ethylhexyl) phthalate in immature and mature rats and effect on testis. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1985;56:30-7.
79. Agarwal DK, Eustis S, Lamb JC, Reel JR, Kluwe WM. Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on the gonadal pathophysiology, sperm morphology, and reproductive performance of male rats. *Environ Health Perspect* 1986;65:343-50.
80. Agarwal DK, Lawrence WH, Turner JE, Autian J. Effects of parenteral di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on gonadal biochemistry, pathology, and reproductive performance of mice. *J Toxicol Environ Health* 1989;26:39-59.
81. Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;128:216-23.
82. Seth PK, Srivastava SP, Agarwal DK, Chandra SV. Effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on rat gonads. *Environ Res* 1976;12:131-8.
83. Tickner, J. A. The Use of Di-2-Ethylhexyl Phthalate in PVC Medical Devices: Exposure, Toxicity, und Alternatives. 1999. University of Massachusetts, Lowell, Lowell Center for Sustainable Production.
84. Hansen DK, Grafton TF. Evaluation of di(2-ethylhexyl)phthalate-induced embryotoxicity in rodent whole-embryo culture. *J Toxicol Environ Health* 1994;43:361-7.
85. Lee HY, Auslander SE, Kalmus GW. Toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate in chick embryos gel electrophoretic analysis of serum proteins. *Comp Biochem Physiol C* 1977;56:9-12.
86. Peters JM, Taubeneck MW, Keen CL, Gonzalez FJ. Di(2-ethylhexyl) phthalate induces a functional zinc deficiency during pregnancy and teratogenesis that is independent of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ . *Teratology* 1997;56:311-6.
87. Shiota K, Chou MJ, Nishimura H. Embryotoxic effects of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) in mice. *Environ Res* 1980;22:245-53.



88. Shiota K, Nishimura H. Teratogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) in mice. *Environ Health Perspect* 1982;45:65-70.
89. Carpenter, C. P. Weil C. S. Smyth H. F. Chronic oral toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate for rats, guinea pigs and dogs. *Arch Ind Hyg Occup Med* 8, 219-226. 1953.
90. Harris RS, Hodge HC Maynard EA Blanchet HJ, Jr. Chronic oral toxicity of 2-ethylhexyl phthalate in rats and dogs. *Arch Ind Health* 13, 259-264. 1956.
91. NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Di-(ethylhexyl) Phthalate (DEHP). NTP CERHR MON 1982.
92. Cattley RC, Conway JG, Popp JA. Association of persistent peroxisome proliferation and oxidative injury with hepatocarcinogenicity in female F-344 rats fed di(2-ethylhexyl)phthalate for 2 years. *Cancer Lett* 1987;38:15-22.
93. Rao KN, Elm MS, Kelly RH, Chandar N, Brady EP, Rao B et al. Hepatic hyperplasia and cancer in rats: metabolic alterations associated with cell growth. *Gastroenterology* 1997;113:238-48.
94. Rao MS, Yeldandi AV, Subbarao V. Quantitative analysis of hepatocellular lesions induced by di(2-ethylhexyl)phthalate in F-344 rats. *J Toxicol Environ Health* 1990;30:85-9.
95. Stumvoll M, Haring HU. Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms. *Ann Med* 2002;34:217-24.
96. Oberkofler H, Schraml E, Krempler F, Patsch W. Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. *Biochem J* 2003;371:89-96.
97. Darteil R, Wang M, Latta-Mahieu M, Caron A, Mahfoudi A, Staels B, Thuillier V. Efficient gene regulation by PPAR gamma and thiazolidinediones in skeletal muscle and heart. *Mol Ther* 2002;6:265-71.
98. Bays H, Stein EA. Pharmacotherapy for dyslipidaemia--current therapies and future agents. *Expert Opin Pharmacother* 2003;4:1901-38.

99. Muoio DM, Way JM, Tanner CJ, Winegar DA, Kliwer SA, Houmard JA et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes* 2002;51:901-9.
100. Northup S, Martis L, Ulbricht R, Garber J, Miripol J, Schmitz T. Comment on the carcinogenic potential of di(2-ethylhexyl) phthalate. *J Toxicol Environ Health* 1982;10:493-518.
101. Empfehlung der IARC. 2000.
102. Crocker JF, Blecher SR, Safe SH. Chemically induced polycystic kidney disease. *Prog Clin Biol Res* 1983;140:281-96.
103. Crocker JF, Safe SH, Acott P. Effects of chronic phthalate exposure on the kidney. *J Toxicol Environ Health* 1988;23:433-44.
104. Schulz, C., Rubin, R. J., and Hutchins, G. M. Acute Lung Toxicity and Sudden Death in Rats Following the intravenous Administration of the Plasticizer, Di(2-ethylhexyl)-Phthalate, Solubilized with Tween Surfactants. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 33, 514-525. 1975.
105. Roth B, Herkenrath P, Lehmann HJ, Ohles HD, Homig HJ, Benz-Bohm G et al. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate as plasticizer in PVC respiratory tubing systems: indications of hazardous effects on pulmonary function in mechanically ventilated, preterm infants. *Eur J Pediatr* 1988;147:41-6.
106. Klimisch HJ, Gamer AO, Hellwig J, Kaufmann W, Jackh R. Di-(2-ethylhexyl) phthalate: a short-term repeated inhalation toxicity study including fertility assessment. *Food Chem Toxicol* 1992;30:915-9.
107. Jaakkola, J. J., Oie, L., Nafstad, P., Botten, G., Samuelson, S. O., and Magnus, P. Interior surface materials in the home and the development of bronchial obstruction in young children in Oslo, Norwa. *Am J Pub Health* 89, 188-192. 1999.
108. Larsen, S. T., Hansen, J. S, Thygesen, P., Begtrup, M., Poulsen, O. M., and Nielsen, G. D. Adjuvant and immuno-suppressive effect of six monophthalates in a subcutaneous injection model with BALB/c mice. *Toxicology* 169[1], 37-51. 2001.

109. Nakamura R, Teshima R, Sawada J. Effect of dialkyl phthalates on the degranulation and Ca<sup>2+</sup> response of RBL-2H3 mast cells. *Immunol Lett* 2002;80:119-24.
110. Glue, C., Platzner, M. H., Larsen, S. T., Nielsen, G. D., Skov, P. S., and Poulsen, L. K. Phthalates Potentiate the Response of Allergic Effector Cells. *Pharmacol.Toxicol* 96, 140-142. 2005.
111. Issemann I, Prince RA, Tugwood JD, Green S. The retinoid X receptor enhances the function of the peroxisome proliferator activated receptor. *Biochimie* 1993;75:251-6.
112. Peters, J. M., Hennuyer, N., Staels, B., Fruchart, J. C., Fievet, C., Gonzalez, F. J., and Auwerx, J. Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ -deficient mice. *J Bio Chem* 272, 27307-27312. 1997.
113. Dreyer, C., Keller, H., Mahfoudi, A., Laudet, V., Krey, G., and Wahli, W. Positive regulation of the peroximal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Bio Cell* 77, 67-76. 1993.
114. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR et al. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999;4:585-95.
115. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999;4:597-609.
116. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 1999;4:611-7.
117. Di Poi N, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Functions of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in skin homeostasis. *Lipids* 2004;39:1093-9.
118. Di Poi N, Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Transcriptional repression of peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta in murine keratinocytes by CCAAT/enhancer-binding proteins. *J Biol Chem* 2005;280:38700-10.
119. Michalik L, Desvergne B, Tan NS, Basu-Modak S, Escher P, Rieusset J et al. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-

- activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *J Cell Biol* 2001;154:799-814.
120. Tan NS, Michalik L, Noy N, Yasmin R, Pacot C, Heim M et al. Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev* 2001;15:3263-77.
  121. Yamada J, Sugiyama H, Watanabe T, Suga T. Suppressive effect of growth hormone on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor in cultured rat hepatocytes. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1995;90:173-6.
  122. Kallen CB, Lazar MA. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit leptin (ob) gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5793-6.
  123. Belury MA, Moya-Camarena SY, Sun H, Snyder E, Davis JW, Cunningham ML, Vanden Heuvel JP. Comparison of dose-response relationships for induction of lipid metabolizing and growth regulatory genes by peroxisome proliferators in rat liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998;151:254-61.
  124. Waxman DJ. Role of metabolism in the activation of dehydroepiandrosterone as a peroxisome proliferator. *J Endocrinol* 1996;150 Suppl:S129-S147.
  125. Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem* 1998;273:16710-4.
  126. Kurebayashi S, Hirose T. [Novel orphan receptor: ROR gamma expressed during adipocyte differentiation]. *Nippon Rinsho* 1998;56:1729-33.
  127. Iijima K, Yoshizumi M, Ako J, Eto M, Kim S, Hashimoto M et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:353-6.
  128. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998;78:783-809.
  129. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1997;272:3406-10.

130. Hegardt FG, Serra D, Asins G. Influence of etomoxir on the expression of several genes in liver, testis and heart. *Gen Pharmacol* 1995;26:897-904.
131. Johnson EF, Palmer CN, Griffin KJ, Hsu MH. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor in cytochrome P450 4A gene regulation. *FASEB J* 1996;10:1241-8.
132. Ferry G, Bruneau V, Beauverger P, Goussard M, Rodriguez M, Lamamy V et al. Binding of prostaglandins to human PPARgamma: tool assessment and new natural ligands. *Eur J Pharmacol* 2001;417:77-89.
133. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995;83:803-12.
134. Inoue I, Noji S, Shen MZ, Takahashi K, Katayama S. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) regulates the plasma thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) level. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:606-10.
135. Johnson EF, Palmer CN, Griffin KJ, Hsu MH. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor in cytochrome P450 4A gene regulation. *FASEB J* 1996;10:1241-8.
136. de Dios ST, Hannan KM, Dilley RJ, Hill MA, Little PJ. Troglitazone, but not rosiglitazone, inhibits Na/H exchange activity and proliferation of macrovascular endothelial cells. *J Diabetes Complications* 2001;15:120-7.
137. Hwang CS, Loftus TM, Mandrup S, Lane MD. Adipocyte differentiation and leptin expression. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:231-59.
138. Csaba G, Inczeffi-Gonda A, Karabelyos C, Pap E. Hormonal imprinting: neonatal treatment of rats with the peroxysome proliferator clofibrate irreversibly affects sexual behaviour. *Physiol Behav* 1995;58:1203-7.
139. Jump DB, Clarke SD, Thelen A, Liimatta M, Ren B, Badin MV. Dietary fat, genes, and human health. *Adv Exp Med Biol* 1997;422:167-76.
140. Melnick RL. Is peroxisome proliferation an obligatory precursor step in the carcinogenicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)? *Environ Health Perspect* 2001;109:437-42.
141. Peck CC, Odom DG, Friedman HI, Albro PW, Hass JR, Brady JT, Jess DA. Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and mono-2-ethylexyl phthalate

(MEHP) accumulation in whole blood and red cell concentrates. Transfusion 1979;19:137-46.

142. Peck CC, Odom DG, Albro PW, Jess DA, Barrett BB. Effect of heat on the conversion of di-2-ethylhexyl phthalate to mono-2-ethylhexyl phthalate in human plasma. Transfusion 1981;21:163-6.
143. Albro PW. Absorption, metabolism, and excretion of di(2-ethylhexyl) phthalate by rats and mice. Environ Health Perspect 1986;65:293-8.
144. Mettang T, Alscher DM, Pauli-Magnus C, Dunst R, Kuhlmann U, Rettenmeier AW. Phthalic acid is the main metabolite of the plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate in peritoneal dialysis patients. Adv Perit Dial 1999;15:229-33.
145. Mettang T, Pauli-Magnus C, Alscher DM, Kirchgessner J, Wodarz R, Rettenmeier AW, Kuhlmann U. Influence of plasticizer-free CAPD bags and tubings on serum, urine, and dialysate levels of phthalic acid esters in CAPD patients. Perit Dial Int 2000;20:80-4.
146. Albro PW, Hass JR, Peck CC, Odam DG, Corbett JT, Bailey FJ et al. Identification of the metabolites of di-(2-ethylhexyl) phthalate in urine from the African green monkey. Drug Metab Dispos 1981;9:223-5.
147. Albro PW, Hass JR, Peck CC, Jordan ST, Corbett JT, Schroeder J. Applications of isotope differentiation for metabolic studies with di-(2-ethylhexyl) phthalate. J Environ Sci Health B 1982;17:701-14.
148. Albro PW, Jordan ST, Schroeder JL, Corbett JT. Chromatographic separation and quantitative determination of the metabolites of di-(2-ethylhexyl) phthalate from urine of laboratory animals. J Chromatogr 1982;244:65-79.
149. Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL, Jordan S, Matthews HB. Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. Environ Health Perspect 1982;45:19-25.
150. Albro PW, Chae K, Philpot R, Corbett JT, Schroeder J, Jordan S. In vitro metabolism of mono-2-ethylhexyl phthalate by microsomal enzymes. Similarity to omega- and (omega-1) oxidation of fatty acids. Drug Metab Dispos 1984;12:742-8.
151. Albro PW. Absorption, metabolism, and excretion of di(2-ethylhexyl) phthalate by rats and mice. Environ Health Perspect 1986;65:293-8.

152. Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL. The metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Comp Biochem Physiol C* 1993;104:335-44.
153. Dirven HA, van den Broek PH, Jongeneelen FJ. Determination of four metabolites of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate in human urine samples. *Int Arch Occup Environ Health* 1993;64:555-60.
154. Egestad B, Sjoberg P. Analysis by fast atom bombardment mass spectrometry of conjugated metabolites of bis(2-ethylhexyl)phthalate. *Biomed Environ Mass Spectrom* 1988;16:151-4.
155. Harvan DJ, Hass JR, Albro PW, Friesen MD. Mass spectrometry of di-(2-ethylhexyl)phthalate metabolites. *Biomed Mass Spectrom* 1980;7:242-6.
156. Mitchell AM, Lhuguenot JC, Bridges JW, Elcombe CR. Identification of the proximate peroxisome proliferator(s) derived from di(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985;80:23-32.
157. Sjoberg P, Bondesson U, Hammarlund M. Non-linearities in the pharmacokinetics of di-(2-ethylhexyl) phthalate and metabolites in male rats. *Arch Toxicol* 1985;58:72-7.
158. [Material monograph on di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP)--reference values for 5oxo-MEHP und 5OH-MEHP in urine]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2005;48:706-22.
159. Jonsson BA, Richthoff J, Rylander L, Giwercman A, Hagmar L. Urinary phthalate metabolites and biomarkers of reproductive function in young men. *Epidemiology* 2005;16:487-93.
160. Zhu ZP, Wang YB, Song L, Chen JF, Chang HC, Wang XR. [Effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate on testosterone biosynthesis in leydig cells cultured from the rat testis]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2005;11:247-51.
161. Awal MA, Kurohmaru M, Andriana BB, Kanai Y, Hayashi Y. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) induces testicular alterations in male guinea pigs at prepubertal stage. *Tissue Cell* 2005;37:167-75.
162. Awal MA, Kurohmaru M, Ishii M, Andriana BB, Kanai Y, Hayashi Y. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) induces spermatogenic cell apoptosis in guinea pig testes at prepubertal stage in vitro. *Int J Toxicol* 2004;23:349-55.
163. Larsen ST, Hansen JS, Hammer M, Alarie Y, Nielsen GD. Effects of mono-2-ethylhexyl phthalate on the respiratory tract in BALB/c mice. *Hum Exp Toxicol* 2004;23:537-45.

164. Kleinsasser NH, Harreus UA, Kastenbauer ER, Wallner BC, Sassen AW, Staudenmaier R, Rettenmeier AW. Mono(2-ethylhexyl)phthalate exhibits genotoxic effects in human lymphocytes and mucosal cells of the upper aerodigestive tract in the comet assay. *Toxicol Lett* 2004;148:83-90.
165. Schmid P, Schlatter C. Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in man. *Xenobiotica* 1985;15:251-6.
166. Albro PW. The metabolism of 2-ethylhexanol in rats. *Xenobiotica* 1975;5:625-36.
167. Deisinger PJ, Boatman RJ, Guest D. Metabolism of 2-ethylhexanol administered orally and dermally to the female Fischer 344 rat. *Xenobiotica* 1994;24:429-40.
168. Kroger, S., Liesivuori, J., and Manninen, A. Evaluation of workers' exposure to 2-ethylhexanoic acid (2-EHA) in Finnish sawmills. A field study. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 62, 213-216. 1990.

Ref Type: Journal (Full)

169. Deisinger PJ, Boatman RJ, Guest D. Metabolism of 2-ethylhexanol administered orally and dermally to the female Fischer 344 rat. *Xenobiotica* 1994;24:429-40.
170. Kambia K, Dine T, Gressier B, Germe AF, Luyckx M, Brunet C et al. High-performance liquid chromatographic method for the determination of di(2-ethylhexyl) phthalate in total parenteral nutrition and in plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;755:297-303.
171. Pollack GM, Slaughter RL, Buchanan JF, Shen DD. High-performance liquid chromatographic procedure for the determination of di-(2-ethylhexyl)phthalate in human blood specimens. Problems of variable-extraction yield and the use of standard addition for calibration. *J Chromatogr* 1984;311:101-8.
172. Asaoka K, Hagihara K, Kabaya H, Sakamoto Y, Katayama H, Yano K. Uptake of phthalate esters, di(n-butyl)phthalate and di(2-ethylhexyl)phthalate, as environmental chemicals in monkeys in Japan. *Bull Environ Contam Toxicol* 2000;64:679-85.
173. Colón, I., Caro, D., Bourdony, C. J., and Rosario, O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ. Health Perspect.* 108, 895-900. 2000.
174. Sjoberg PO, Bondesson UG, Sedin EG, Gustafsson JP. Exposure of newborn infants to plasticizers. Plasma levels of di-(2-ethylhexyl)



phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate during exchange transfusion. *Transfusion* 1985;25:424-8.

175. Kato, K., Silva, M. J., and Brock, J. W. Quantitative detection of nine phthalate metabolites in human serum using reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Anal. Toxicol* 27, 284-289. 2003.
176. Inoue K, Kawaguchi M, Okada F, Yoshimura Y, Nakazawa H. Column-switching high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry coupled with on-line of extraction for the determination of mono- and di-(2-ethylhexyl) phthalate in blood samples. *Anal Bioanal Chem* 2003;375:527-33.
177. Draviam, E. J., Kerkay, J., and Pearson, K. H. Separation and quantification of urinary phthalates by HPLC. *Anal. Lett.* 13B, 1729-1750. 1980.
178. Draviam, E. J., Pearson, K. H., and Kerkay, J. Human metabolism of bis(2-ethylhexyl)phthalate. *Anal. Lett.* 15B, 1137-1155. 1982.
179. Egestad B, Sjoberg P. Analysis by fast atom bombardment mass spectrometry of conjugated metabolites of bis(2-ethylhexyl) phthalate. *Biomed Environ Mass Spectrom* 1988;16:151-4.
180. Albro, P. W., Jordan, S., Corbett, J. T., and Schroeder, J. L. Determination of total phthalate in urine by gas chromatography. *Anal Chem* 56, 247-250. 1984.
181. Koch HM, Gonzalez-Reche LM, Angerer J. On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;784:169-82.
182. Anderson WA, Castle L, Scotter MJ, Massey RC, Springall C. A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters. *Food Addit Contam* 2001;18:1068-74.
183. Koch HM, Gonzalez-Reche LM, Angerer J. On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and

secondary phthalate metabolites in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;784:169–82.

184. Dirven HA, van den Broek PH, Jongeneelen FJ. Determination of four metabolites of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate in human urine samples. *Int Arch Occup Environ Health* 1993;64:555–60.
185. Schmid P, Schlatter C. Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in man. *Xenobiotica* 1985;15:251–6.
186. Anderson WA, Barnes KA, Castle L, Damant AP, Scotter MJ. Determination of isotopically labelled monoesterphthalates in urine by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Analyst* 2002;127:1193–7.
187. Blount, B. C., Milgram, K. E., and Silva, M. J. Quantitative detection of eight phthalate metabolites in human urine using HPLC-APCI-MS/MS. *Anal Chem* 72, 4127–4134. 2000.
188. Hoppin JA, Brock JW, Davis BJ, Baird DD. Reproducibility of urinary phthalate metabolites in first morning urine samples. *Environ Health Perspect* 2002;110:515–8.
189. Silva MJ, Malek NA, Hodge CC, Reidy JA, Kato K, Barr DB et al. Improved quantitative detection of 11 urinary phthalate metabolites in humans using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;789:393–404.
190. Koch HM, Gonzalez-Reche LM, Angerer J. On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;784:169–82.
191. Barr DB, Silva MJ, Kato K, Reidy JA, Malek NA, Hurtz D et al. Assessing human exposure to phthalates using monoesters and their oxidized metabolites as biomarkers. *Environ Health Perspect* 2003;111:1148–51.
192. Preuss R, Koch HM, Angerer J. Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;816:269–80.
193. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and

- antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 2003;52:1655–63.
194. Giam CS, Chan HS, Neff GS, Atlas EL. Phthalate ester plasticizers: a new class of marine pollutant. *Science* 1978;199:419–21.
  195. <http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi>.  
<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi> . 2006.
  196. Scharmann, w. and Teutsch, G. M. Zur ethischen Abwägung von Tierversuchen. *Altex* 11, 191–198. 1994.
  197. Liebich, H., Wirth, C., and Jakober, B. Analysis of polyunsaturated fatty acids in blood serum after fish oil administration. *J Chromatogr.* 572, 1–9. 1991.
  198. Lepage, G. and Roy, C. G. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J lipid res* 27, 114–120. 1986.
  199. Sjöberg P, Bondesson U. Determination of di(2-ethylhexyl) phthalate and four of its metabolites in blood plasma by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr* 1985;344:167–75.
  200. Wahl, H. G., Hong, Q., Stübe, D., Maier, M. E., Häring, H. U., and Lienich, H. M. Simultaneous analysis of the di(ethylhexyl)phthalate metabolites 2-ethylhexanoic acid, 2-ethyl-3-hydroxyhexanoic acid and 2-ethyl-3-oxohexanoic acid in urine by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 758, 213–219. 2001.
  201. Sjöberg P, Bondesson U. Determination of di(2-ethylhexyl) phthalate and four of its metabolites in blood plasma by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr* 1985;344:167–75.
  202. Wahl HG, Hoffmann A, Haring HU, Liebich HM. Identification of plasticizers in medical products by a combined direct thermodesorption–cooled injection system and gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1999;847:1–7.
  203. Wahl HG, Hong Q, Stube D, Maier ME, Haring HU, Liebich HM. Simultaneous analysis of the di(2-ethylhexyl)phthalate metabolites 2-ethylhexanoic acid, 2-ethyl-3-hydroxyhexanoic acid and 2-ethyl-3-

- oxohexanoic acid in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;758:213-9.
204. Skoog DA, Leary JJ. *Instrumentelle Analytik*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 1996.
  205. Hallbach J. *Klinische Chemie für den Einstieg*. Thieme Verlag, 2001.
  206. Suzuki T, Yaguchi K, Suzuki S, Suga T. Monitoring of phthalic acid monoesters in river water by solid-phase extraction and GC-MS determination. *Environ Sci Technol* 2001;35:3757-63.
  207. Wahl HG, Hong Q, Stube D, Maier ME, Haring HU, Liebich HM. Simultaneous analysis of the di(2-ethylhexyl)phthalate metabolites 2-ethylhexanoic acid, 2-ethyl-3-hydroxyhexanoic acid and 2-ethyl-3-oxohexanoic acid in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;758:213-9.
  208. Haishima Y, Seshimo F, Higuchi T, Yamazaki H, Hasegawa C, Izumi S et al. Development of a simple method for predicting the levels of di(2-ethylhexyl) phthalate migrated from PVC medical devices into pharmaceutical solutions. *Int J Pharm* 2005;298:126-42.
  209. Inoue K, Kawaguchi M, Yamanaka R, Higuchi T, Ito R, Saito K, Nakazawa H. Evaluation and analysis of exposure levels of di(2-ethylhexyl) phthalate from blood bags. *Clin Chim Acta* 2005;358:159-66.
  210. Wahl HG, Hong Q, Stube D, Maier ME, Haring HU, Liebich HM. Simultaneous analysis of the di(2-ethylhexyl)phthalate metabolites 2-ethylhexanoic acid, 2-ethyl-3-hydroxyhexanoic acid and 2-ethyl-3-oxohexanoic acid in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;758:213-9.
  211. Mettang T, Thomas S, Kiefer T, Fischer FP, Kuhlmann U, Wodarz R, Rettenmeier AW. The fate of leached di(2-ethylhexyl)phthalate in patients undergoing CAPD treatment. *Perit Dial Int* 1996;16:58-62.
  212. Mettang T, Pauli-Magnus C, Alscher DM, Kirchgessner J, Wodarz R, Rettenmeier AW, Kuhlmann U. Influence of plasticizer-free CAPD bags and tubings on serum, urine, and dialysate levels of phthalic acid esters in CAPD patients. *Perit Dial Int* 2000;20:80-4.
  213. Wahl, H. G. *Habilitationsschrift: Nachweis und klinische Relevanz von 4-Heptanon als Endmetabolite des Weichmachers Di(2-ethylhexyl) Phthalat*. 2004. Philipps-Universität Marburg.

214. Muringaseril, S. Promotion: Die Wirkung von DEHP und MEHP auf Endothelzellen HMEC-1. 2007. Philipps-Universität Marburg.
215. Zhang, D. H., Cohn, L., Ray, P., Bottomly, K., and Ray, A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukine-5 gene. *J Biol.Chem.* 272[34], 21597–21603. 1997.
216. Usui, T., Preiss, J. C., Kanno, Y., Yao, Z. J., Bream, J. H., and O'Shea, J. J. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med* 203[3], 755–766. 2006.
217. Braun, A., Quarcoo, D., Schulte-Herbruggen, O., Lommatzsch, M., Hoyle, G, and Renz, H. Nerve growth factor induces airway hyperresponsiveness in mice. *Allergy Immunol* 124, 205–212. 2001.
218. Bonini, S., Lambiase, A., Bonini, S., Angelucci, F., Magrini, L., and Aloe, L. Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 10955–10963. 1996.
219. Braun, A., Appel, E., Baruch, R., Herz, U., Botchkarev, V., Paus, R., Brodie, C., and Renz, H. Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur.J Immunol* 28, 3240–3251. 1998.
220. Päth, G., Braun, A., Meents, N., Kerzel, S., Quarcoo, D., Raap, U., Hoyle, G, Nockher, W. A., and Renz, H. Augmentation of Allergic Early-Phase Reaction by Nerve Growth Factor. *Am J Resp Crit Care Med* 166, 818–826. 2002.
221. Azevedo, I., de Blic, J., Scheinmann, P., Vargaftig, B. B., and Bachelet, M. Enhanced arachidonic acid metabolism in alveolar macrophages from wheezy infants. Modulation by dexamethasone. *Am J Resp Crit Care Med* 152[4], 1208–1214. 1995.
222. Asanuma, F., Kuwabara, K., Arimura, A., Furue, Y., Fleisch, J. H., and Hori, Y. Effects of leukotien B4 receptor antagonist, LY293111Na,

- on antigen-induced bronchial hyperresponsiveness and leukocyte infiltration in sensitized guinea pigs. *Inflamm Res.* 50[3], 136–141. 2001.
223. Montuschi, P., Martello, S., Felli, M., Mondino, C., Barnes, P. J., and Chiarotti, M. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotrien B<sub>4</sub> in asthmatic children. *Respir Res.* 6, 119–128. 2005.
  224. Wollin, L., Marx, D., Wohlsen, A., and Beume, R. Roflumilast inhibition of pulmonary leukotriene production and bronchoconstriction in ovalbumin-sensitized and -challenged Guinea pigs. *J Asthma* 42[10], 873–878. 2005.
  225. El Gazzer, M., El Mezayen, R., Nicolld, M. R., Marecki, J. C., and Dreskin, S. C. Downregulation of leukotriene biosynthesis by thymoquinone attenuates airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Biochim.Biophys.Acta* epub ahead of print. 2006.
  226. Von Schacky C. Omega-3-Fettsäuren – schon klinisch einsetzbar? *Dtsch Med Wschr* 115, 224–231. 1990.
  227. Bjoerneboe A., Soyland E., Bjoernboe G-EA, Rajka G., and Drevon CA. Effects of n-3 fatty acid supplement to patients with atopic dermatitis. *J Intern Med* 25 Suppl 1, 233–236. 1989.

## 9. Danksagung

An dieser Stelle danke ich besonders Herrn Prof. Ensinger und Herrn PD Dr. R. Wahl für die Überlassung des Themas, sowie der stets guten Betreuung und den interessanten Fachgesprächen in den jeweiligen Fachbereichen der Chemie und der Medizin. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Renz für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und für die Möglichkeit, die Arbeit so interessant und vielfältig gestalten zu können, wie es ohne die Zusammenarbeit mit der Medizin nicht möglich gewesen wäre.

Den Herren D. Severin und Dr. T. Zimmermann, danke ich für die vielen Anregungen und Gespräche, die trotz der räumlichen Trennung regelmäßig zustande kamen.

Selbiges gilt für die Doktores S. Sel, M. Wegmann, N. Blümer, C. Hahn und H. Garn für die hilfsbereite Einarbeitung in alle Themen der Molekularbiologie und der Tierversuche, von denen ich als Chemiker zunächst keine Ahnung hatte. Auch danach standen sie mir immer für Fragen und Experimente zu Seite.

Ein besonderer Dank gilt den Damen und Herren im Zentrallabor des Klinikums, die mich freundlich aufgenommen haben, obwohl ich eine stete Störung im Routinebetrieb war.

Zum Schluss sei an dieser Stelle meinen Eltern gedankt, die mir ein aufwändiges Studium und die anschließende Promotion ermöglicht haben. Besonderer Dank gilt meiner Freundin Maike, die mich tatkräftig unterstützt hat, als es darum ging meine Arbeit abzuschließen. Ohne ihre treibende Hilfe würde ich wohl noch heute schreiben.